

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Patología ANimal I



TESIS DOCTORAL

**Síntesis de enteroxinas estafilocócicas en los alimentos de
tipo de elevado consumo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

M^a Esperanza Gómez-Lucía Duato

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Patología Animal I

TP
1988
100



* 5 3 0 9 8 7 4 9 1 0 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-638205-1

**SINTESIS DE ENTEROTOXINAS
ESTAFILOCOCCICAS EN ALIMENTOS TIPO DE
ELEVADO CONSUMO**

M.^a Esperanza Gómez-Lucía y Duato

Madrid, 1988



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. N.º 100/88

© **M. Esperanza Gómez-Lucía y Duato**

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 - 28015 Madrid
Madrid, 1988
Ricoh 3700
Depósito Legal: M-4071-1988**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

SINTESIS DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS EN
ALIMENTOS TIPO DE ELEVADO CONSUMO

Ma ESPERANZA GOMEZ-LUCIA Y DUATO

Memoria presentada para
optar al grado de Doctor
en Veterinaria.

Madrid 1985



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DON GUILLERMO SUAREZ FERNANDEZ, CATEDRATICO DE MICROBIOLOGIA
DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID,

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral que lleva por título
"SINTESIS DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS
EN ALIMENTOS TIPO DE ELEVADO CONSUMO", de la
que es autora la Licenciada en Veterinaria
Da Ma ESPERANZA GOMEZ-LUCIA Y DUATO, se ha
realizado en los laboratorios del Departamento
de Microbiología de esta Facultad bajo nuestra
dirección, destacando su elevada densidad
experimental y la contribución positiva del
planteamiento propuesto, tal y como se refleja
en las conclusiones alcanzadas.
Y para que conste a los efectos oportunos, firmo
el presente certificado en Madrid a veintiocho
de Agosto de mil novecientos ochenta y cinco.

A mi Madre

A Rafael

A Pepe

A la memoria de mi Padre

El alma en trance de abstraer y de
quintaesenciar, conciencia científica
dolorosa, librada a los intereses
inductivos siempre imperfectos, jugando
el peligroso juego del pensamiento sin
soporte experimental estable; poniendo
incesantemente en duda un derecho
particular a la abstracción, pero ¡cuán
segura de que la abstracción es un deber,
el deber científico, y la posesión
finalmente depurada del pensamiento del
mundo!

Gaston Bachelard

La formación del espíritu
científico

INDICE

CAPITULO I: GENERALIDADES.....	1
A. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	2
A.1. PERSPECTIVA HISTORICA.....	2
A.2. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS.....	3
A.2.1. SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE LAS ENTEROTOXINAS.....	3
A.2.2. LOCALIZACION MOLECULAR DEL CARACTER DE ENTEROTOXIGENICIDAD.....	14
A.2.3. EFECTO DE LAS MODIFICACIONES QUIMICAS	15
A.3. SINTESIS DE LAS ENTEROTOXINAS.....	19
A.3.1. GENETICA Y MECANISMO DE SINTESIS.....	19
A.3.2. LOCALIZACION CELULAR DE LA SINTESIS Y TRANSPORTE EXTRACELULAR.....	24
A.3.3. FASE DE CRECIMIENTO.....	28
A.3.4. FACTORES QUE AFECTAN A LA SINTESIS DE LAS ENTEROTOXINAS.....	29
A.3.4.a. SUSTANCIAS EN SOLUCION.....	29
A.3.4.b. TEMPERATURA.....	34
A.3.4.c. TIEMPO.....	36
A.3.4.d. ATMOSFERA Y EMPAQUETADO.....	37
A.3.4.e. VALOR pH.....	40
A.3.4.f. ACTIVIDAD DE AGUA.....	40
A.3.4.g. CLORURO SODICO.....	40
A.3.4.h. NITRATOS Y NITRITOS.....	41

A.3.4.1. FLORA COMPETIDORA.....	43
A.3.5. DIFERENCIAS ENTRE LA SINTESIS DE LAS ENTEROTOXINAS.....	47
A.4. PATOGENIA.....	48
A.4.1. SINTOMAS.....	49
A.4.2. DOSIS TOXICA MINIMA.....	50
A.4.3. EXPERIMENTACION ANIMAL.....	51
A.4.4. MECANISMO DE ACCION.....	52
A.4.5. EFECTOS INDUCIDOS.....	54
A.4.5.a. EFECTOS GASTRICOS.....	54
A.4.5.b. EFECTOS PIROGENICOS.....	57
A.4.5.c. OTROS EFECTOS.....	57
A.4.6. EFECTOS SOBRE CULTIVOS TISULARES.....	60
A.5. ANALISIS DE ENTEROTOXINA EN MEDIOS ARTIFICIA- LES Y EN ALIMENTOS.....	61
A.5.1. METODOS BIOLOGICOS.....	63
A.5.2. METODOS INMUNOLOGICOS.....	64
A.5.2.1. REACCIONES DE INMUNODIFUSION EN GEL.....	66
A.5.2.2. HEMAGLUTINACION Y TECNICAS AFINES.....	69
A.5.2.3. TECNICAS CON REACTIVOS MARCA- DOS.....	73
A.5.2.3.a. INMUNOFLUORESCENCIA	73
A.5.2.3.b. RADIODINMUNOANALISIS	73
A.5.2.3.c. METODO ELISA.....	78
A.6. ESTABILIDAD DE LAS ENTEROTOXINAS.....	82
A.6.1. EFECTO DEL CALOR.....	83

-iii-

A.6.2. EFECTO DEL pH.....	86
A.6.3. EFECTO DE LAS PROTEASAS.....	87
A.6.4. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO.....	88
A.7. EPIDEMIOLOGIA.....	88
A.7.1. FUENTES DE LOS ESTAFILOCOCOS.....	88
A.7.2. ALIMENTOS IMPLICADOS.....	90
A.7.3. BROTES HABIDOS EN ESPAÑA EN LOS ULTIMOS AÑOS.....	96
B. MATERIALES Y METODOS.....	97
B.1. LUGAR DE TRABAJO.....	97
B.2. MATERIALES.....	97
B.2.1. MATERIAL DE LABORATORIO.....	97
B.2.2. MUESTRAS DE ALIMENTOS.....	98
B.2.2.a. Queso tipo manchego.....	99
B.2.2.b. Mayonesa.....	105
B.2.2.c. Leche condensada.....	107
B.2.3. CEPAS DE <u>S. aureus</u>	107
B.2.3.a. Cepas empleadas.....	107
B.2.3.b. Material para verificar la producción de enterotoxinas.....	107
B.2.4. MATERIAL PARA EL RECuento DE MICROORGANISMOS.....	110
B.2.4.a. Medios de cultivo.....	110
B.2.4.b. Diluyente.....	113
B.2.5. MATERIAL PARA LA PRODUCCION DE ANTISUEROS ESPECIFICOS.....	114
B.2.5.a. Animales de experimentación.....	115

B.2.5.b. Extracción de sangre y obtención del suero.....	117
B.2.5.c. Titulación del suero.....	117
B.2.5.d. Purificación del suero.....	120
B.2.5.e. Marcado de las inmunoglobulinas con peroxidasa.....	123
B.2.6. MATERIAL PARA LA EXTRACCION DE ENTEROTOXINAS A PARTIR DE LOS ALIMENTOS....	125
B.2.7. MATERIAL PARA EL ANALISIS DE ENTEROTOXINAS.....	127
B.2.7.a. Técnica de la doble difusión en gel de agar en microporta	127
B.2.7.b. Técnica de doble difusión en gel de agar de sensibilidad óptima en placas (O.S.P.)...	128
B.2.7.c. Método E.L.I.S.A.....	131
B.2.8. DETECCION DE RIBONUCLEASAS (DNasa Y TNasa).....	134
B.3. METODOS.....	135
B.3.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE ALIMENTOS.....	135
B.3.1.a. Queso tipo manchego.....	135
B.3.1.b. Mayonesa.....	140
B.3.1.c. Leche condensada.....	143
B.3.2. INCUBACION Y ESTUDIO.....	144
B.3.2.a. Inoculación.....	144
B.3.2.b. Parámetros de incubación....	145

B.3.2.c. Toma de muestras y técnica de recuento.....	145
B.3.3. INDUCCION A LA PRODUCCION DE ENTERO- TOXINAS.....	149
B.3.4. METODO DE EXTRACCION DE ENTEROTOXINAS A PARTIR DE LOS ALIMENTOS.....	151
B.3.4.a. Primera fase.....	151
B.3.4.b. Segunda fase.....	153
B.3.5. METODOS DE PRODUCCION DE REACTIVOS PA- RA SU EMPLEO EN ELISA.....	158
B.3.5.a. Inmunización de conejos.....	158
B.3.5.b. Extracción de la sangre y ob- tención del suero.....	160
B.3.5.c. Titulación del nivel de anti- cuerpos específicos.....	162
B.3.5.d. Purificación del suero.....	164
B.3.5.e. Marcado con peroxidasa.....	167
B.3.6. METODOS PARA EL ANALISIS DE ENTEROTO- XINAS.....	168
B.3.6.a. Técnica del doble difusión en gel de agar en microporta...	168
B.3.6.b. Método en placa de doble di- fusión con sensibilidad ópti- ma.....	172
B.3.6.c. Método de enzimoimmunoaná- lisis (ELISA).....	173
B.3.7. METODO DE DETECCION DE NUCLEASAS.....	177
B.3.8. METODOS ESTADISTICOS.....	178

C. INTERES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	180
CAPITULO II: QUESO TIPO MANCHEGO.....	187
A. INTRODUCCION	188
A.1. QUESO MANCHEGO.....	188
A.2. BROTES EN LOS QUE DISTINTOS QUESOS HAN SIDO INCUPLADOS COMO CAUSANTES DE INTOXICACION ESTAFILOCOCCICA.....	190
A.3. ORIGEN DE LA CONTAMINACION.....	192
A.4. FACTORES QUE CONTROLAN EL CRECIMIENTO DE ESTAFILOCOCCOS EN LOS QUESOS.....	196
A.4.1. Cultivo iniciador.....	196
A.4.2. Valor pH.....	200
A.4.3. Actividad de agua.....	200
A.4.4. Cloruro sódico.....	200
A.4.5. Otros.....	201
A.5. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES TECNOLOGICAS DE ELABORACION DEL QUESO EN EL DESARROLLO DE LOS ESTAFILOCOCCOS Y EN LA PRODUCCION DE ENTE- ROTOXINAS.....	202
A.6. EVOLUCION DE LOS ESTAFILOCOCCOS DURANTE EL PERIODO DE MADURACION DE LOS QUESOS.....	205
B. RESULTADOS	208
B.1. ETAPA DE FABRICACION DEL QUESO.....	209
B.2. VARIACIONES EN EL pH EN EL PROCESO DE FABRI- CACION.....	216
B.3. VARIACIONES EXPERIMENTADAS EN LOS QUESOS CON pH MODIFICADO.....	219

-vii-

B.4. VALORES DE DNasa Y TNasa OBTENIDOS.....	220
B.5. EVOLUCION DE LOS MICROORGANISMOS A LO LARGO DEL PERIODO DE MADURACION.....	225
B.5.1. SALADO EN SALMUERA.....	225
B.5.2. PERIODO DE MADURACION.....	226
B.6. SINTESIS DE ENTEROTOXINAS A LO LARGO DEL PE- RIODO DE MADURACION.....	243
C. DISCUSION	245
C.1. DESARROLLO DE ESTAFILOCOCOS EN EL PERIODO DE MADURACION.....	251
C.2. DESARROLLO DE FLORA NO ESTAFILOCOCCICA EN EL PROCESO DE ELABORACION.....	257
C.3. EVOLUCION DE LOS VALORES DE pH.....	260
C.4. VALORES DE DNasa Y TNasa OBTENIDOS.....	262
C.5. PERDIDAS DE ESTAFILOCOCOS EN EL SUERO.....	270
C.6. DIFERENCIAS DE RECuento EN LAS PRIMERAS 24 HORAS (SALAZONADO).....	271
C.7. PERIODO DE MADURACION.....	276
C.7.1. EVOLUCION DE LOS ESTAFILOCOCOS.....	276
C.7.2. EVOLUCION DEL pH.....	277
C.7.3. SINTESIS DE ENTEROTOXINAS.....	278
CAPITULO III: MAYONESA.....	284
A. INTRODUCCION	285
A.1. MAYONESA.....	285
A.2. BROTES EN LOS QUE HAN SIDO INCULPADOS ALIMENTOS CON MAYONESA.....	286

-viii-

A.3. ORIGEN DE LA CONTAMINACION.....	287
A.4. FACTORES QUE CONTROLAN EL CRECIMIENTO.....	288
B. RESULTADOS	336
B.1. INFLUENCIA DEL pH DE LA MAYONESA.....	341
B.2. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION..	345
B.3. INFLUENCIA DEL TIPO DE ACEITE UTILIZADO EN LA PREPARACION DE LAS MAYONESAS.....	349
B.4. INFLUENCIA DEL INOCULO INICIAL.....	350
B.5. EVOLUCION DEL DESARROLLO DE LAS DISTINTAS CEPAS.....	351
B.6. VARIACIONES DEL pH DE LAS MUESTRAS.....	353
B.7. RELACION ENTRE EL CRECIMIENTO DE <i>S. aureus</i> Y LA PRODUCCION DE DESOXRIBONUCLEASA TERMO- ESTABLE.....	356
C. DISCUSION	358
C.1. INFLUENCIA DEL pH.....	361
C.2. INFLUENCIA DEL INOCULO.....	367
C.3. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.....	368
C.4. INFLUENCIA DEL ACEITE.....	370
C.5. EVOLUCION DE LA SINTESIS DE ENTEROTOXINAS CON RESPECTO AL TIEMPO.....	370
C.6. EVOLUCION DE LOS VALORES DE pH.....	372
C.7. RELACION ENTRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUC- CION DE DESOXRIBONUCLEASA.....	373
C.8. MAYONESAS COMERCIALES.....	375
CAPITULO IV: LECHE CONDENSADA.....	377

A. <u>INTRODUCCION</u>	378
A.1. LECHE CONDENSADA.....	378
A.2. EFECTOS DE LA a_w EN MEDIOS LABORATORIALES...	381
A.3. EFECTO DE LA a_w SOBRE LA SINTESIS DE ENTERO- TOXINAS.....	382
A.4. EFECTO DE LA a_w SOBRE EL CRECIMIENTO DE ES- TAFILOCOCCOS Y LA SINTESIS DE ENTEROTOXINA EN ALIMENTOS.....	384
A.5. EFECTO DEL HUMECTANTE EMPLEADO.....	386
A.6. RESISTENCIA A LA INACTIVACION.....	387
B. <u>RESULTADOS</u>	422
B.1. EVOLUCION DEL DESARROLLO DE LAS DISTINTAS CEPAS.....	422
B.2. INFLUENCIA DE LA MARCA.....	424
B.3. INFLUENCIA DEL INOCULO SOBRE EL DESARROLLO DE <u>S.aureus</u>	425
B.4. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION..	428
C. <u>DISCUSION</u>	432
C.1. EFECTO DEL AZUCAR.....	434
C.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	436
C.3. EFECTO DEL INOCULO.....	438
C.4. EFECTO DE LA MARCA DE LECHE CONDENSADA EMPLEADA.....	439
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RESUMEN.....	440
CONCLUSIONES.....	441
RESUMEN.....	446

-X-

AGRADECIMIENTOS.....	459
BIBLIOGRAFIA.....	462

CAPITULO I:

GENERALIDADES

A. REVISION BIBLIOGRAFICA

A.1. PERSPECTIVA HISTORICA

Las intoxicaciones estafilocócicas hicieron su entrada en la historia científica escrita como un brote que adquirió alarmantes proporciones, afectando a 300 individuos en el estado de Michigan (EE.UU) en el año 1884. Al estudiar las muestras de queso de tipo Cheddar VAUGHN (1884) observó unos microorganismos redondeados, sugiriendo que secretaban una sustancia química capaz de provocar el síndrome. Ese mismo año ROSENBACH estableció las características del género Staphylococcus. Posteriormente, DENYS (1894) observó un síndrome similar en Bélgica, y DWEN (1907) en EE.UU. En otra zona del mundo, en Filipinas, BARBER (1914) aisló unos microorganismos probablemente estafilococos a partir de leche mamética y estableció una relación entre esta secreción y la enfermedad.

La hipótesis que VAUGHN había sugerido en los años en que se descubrió la naturaleza toxínica del tétanos, la difteria y el botulismo fue verificada por DACK et al. (1930) casi 50 años después. Estos demostraron que los filtrados acelulares de estafilococos dorados procedentes de pasteles de Navidad rellenos de crema y sospechosos de haber producido intoxicación reproducían el síndrome al ser inoculados a individuos voluntarios. Se propuso entonces el nombre de

enterotoxina porque su ingestión determinaba vómitos y diarrea.

En 1953 se demostró de forma concluyente la existencia de más de un tipo inmunológico de enterotoxina estafilocócica (SURGALLA et al., 1953) estableciéndose en el 62nd Congress of the American Society for Microbiology (Kansas, 1962) que las enterotoxinas de origen estafilocócico seguirían una nomenclatura alfabética, conforme al orden cronológico de su descubrimiento. Siguiendo este criterio, CASMAN et al., (1963) propusieron que los tipos que habían sido tentativamente denominados "F" (food) y "E" (enteritis) adoptaran en lo sucesivo el nombre de enterotoxina A y enterotoxina B, respectivamente, siendo sus especies prototipo la "196E" y la "243".

A.2. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

A.2.1. SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE LAS ENTEROTOXINAS

A.2.2. LOCALIZACION MOLECULAR DEL CARACTER DE ENTEROTOXIGENICIDAD

A.2.3. EFECTO DE LAS MODIFICACIONES QUIMICAS

A.2.1. SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE LAS ENTEROTOXINAS.

Las enterotoxinas estafilocócicas son exoproteínas simples que contienen aminoácidos de forma exclusiva, compuestas por

una única cadena polipeptídica de peso molecular entre 26.000 y 30.000 dalton. Poseen propiedades higroscópicas y son muy solubles en agua y en soluciones salinas. Su carácter proteico quedó completamente confirmado al ser producidas en grandes cantidades, purificadas y estudiadas sus propiedades físico-químicas.

Se han identificado hasta la fecha ocho enterotoxinas diferentes, utilizando como carácter diferencial el resultado obtenido en distintas reacciones inmunológicas: enterotoxina A (CASMAN, 1960), B (BERGDOLL et al., 1959), C1 y C2 (BERGDOLL et al., 1965), C3 (BERGDOLL et al., 1979), D (CASMAN, 1967), E (BERGDOLL et al., 1971) y F (BERGDOLL et al., 1981). La identificación de las enterotoxinas se basa en la demostración de las reacciones visibles con los anticuerpos específicos respectivos; en el caso de los distintos tipos de enterotoxina C, todas reaccionan con el mismo anticuerpo principal, mostrando así mismo anticuerpos secundarios propios (LEE et al., 1980), lo que pone de manifiesto que las estructuras son diferentes. En la práctica, las diferencias entre la EEC1 y la EEC2 tienen escasa importancia, ya que ambas toxinas se evidencian por el mismo anticuerpo.

Inicialmente, la identificación de una enterotoxina se basaba en el desencadenamiento de emesis en los monos cuando se administraba por vía intragástrica a los animales el líquido sobrenadante del cultivo de una cepa. Se sabe que todavía

existen enterotoxinas no identificadas ya que inducen el vómito en monos según lo expuesto, pero se desconoce qué porcentaje podrían representar, aunque el análisis de las cepas implicadas en intoxicaciones alimentarias indica que alrededor del 5% de los brotes pudieran ser consecuencia de enterotoxinas no identificadas. Por lo general, éstas son producidas en pequeñas cantidades y son difíciles de purificar, radicando en este factor el retraso en su caracterización.

La purificación se hace indispensable para el estudio bioquímico de estas sustancias. Los procedimientos utilizados han sido descritos en la literatura de manera exhaustiva (BERGDOLL et al., 1959; CHU et al., 1966; AVENA y BERGDOLL, 1967; BORJA y BERGDOLL, 1967; BORJA et al., 1972; CHANG y BERGDOLL, 1979; REISER y BERGDOLL, 1979; REISER et al., 1983). Los métodos actuales de purificación incluyen resinas de intercambio iónico, tales como CG-50 (una resina de tipo carboxílico), carboximetil-celulosa y la gama de Sephadex (por exclusión molecular).

Algunas de las propiedades físicas y químicas se exponen en la tabla II. Parece haber ciertas diferencias entre las dosis eméticas para los monos, pero esto es en cierta medida explicable por tratarse de experimentos "in vivo" en los que es difícil controlar todas las variables y donde la respuesta individual adquiere unas dimensiones propias, por lo que los resultados indicados pueden no reflejar la toxicidad

verdadera de cada enterotoxina en concreto.

La única enterotoxina cuyo peso molecular se conoce con exactitud es la EEB (28.366 dalton), ya que se ha podido establecer su secuencia aminoacídica por técnicas de oxidación, reducción, electroforesis y cromatografía (HUANG y BERGDOLL, 1970a, 1970b, 1970c). Los pesos moleculares que se barajaron al principio para las EEA, EEC y EEB oscilaban alrededor de 35.000, aunque posteriormente los estudios parecen indicar que se aproximen más a los valores señalados en la tabla I1 (BERGDOLL, 1983). Se ha determinado que el peso molecular de EEF es aproximadamente 24.000.

Existen diferencias entre los puntos isoeléctricos reseñados para las diferentes enterotoxinas, ya que se obtiene más de un pico con una diferencia entre ellos de aproximadamente 0.4 unidades de pH. En un principio, CHU et al. (1966) determinaron por cromatografía de papel que el punto isoeléctrico de la EEA era 6.8, pero por enfoque isoeléctrico se han revelado cuatro picos con pH de 8.14, 7.68, 7.26 y 6.64, por lo que el pI es superior al original, mientras que ROBERN et al. (1974) con la misma técnica obtuvieron fracciones con pH de 8.60, 8.10, 7.60, 7.21 y 6.7. CHANG y DICKIE (1971) localizaron más de un componente en la enterotoxina B mediante enfoque isoeléctrico y sugirieron que la diferencia de fracciones pudiera ser debida a hidrólisis parcial de los grupos amidos de la glutamina y la asparagina en la proteína en el transcurso de la técnica. Según SPERO et

al. (1974) los estafilococos sintetizan sólo uno de los componentes, que se convierte de una forma a otra por un enzima tal como la amidohidrolasa. Mediante la exposición de la toxina a pH 9.0 a 37C pudieron eliminar los grupos amido, con lo que se demostró la facilidad con que ésto se producía en algunos de estos grupos, siguiendo el modelo de las reacciones de primer orden. La enterotoxina C1 se transformaba en moléculas menos básicas por el tratamiento con álcalis, pero no alcanzaba el estado de EEC2, aunque el punto isoeléctrico obtenido era similar al de esta última (METZGER et al., 1975). Aún cuando estas dos enterotoxinas comparten determinantes antigénicos principales, también gozan de otros secundarios que les son propios y que no se transforman por las conversiones (LEE et al., 1980); la enterotoxina C2 es mucho más resistente a la conversión, siendo ésta sólo posible mediante el tratamiento prolongado con álcalis. METZGER et al. (1972) purificaron EEB con un pI de 9.4, indicando que a este pI es al que la bacteria sintetiza dicha toxina. Se puede concluir que los puntos isoeléctricos de las enterotoxinas cuando se sintetizan inicialmente pueden no coincidir con el de purificación; no obstante, esto no implicaría repercusiones, ya que al aislarse las fracciones no parecen existir diferencias en las actividades tanto tóxicas como inmunológicas (CHANG y DICKIE, 1971).

A partir de la ecuación de Scheraga y Mandelkern, BERGDOLL et al. (1974) supusieron que las enterotoxinas eran moléculas

Tabla 12: Composición aminoacídica de las enterotoxinas (g/100 g de proteína). (Tomado de BERGDOLL;1983).

Amino acid	A	B	C ₁	C ₂	C ₃	D	E	F
Lysine	11.26	14.85	14.43	13.99	13.73	12.93	10.83	12.16
Histidine	3.16	2.34	2.91	2.87	2.96	2.66	3.04	2.69
Arginine	4.02	2.69	1.71	1.75	1.62	3.38	4.50	2.80
Aspartic acid	15.53	18.13	17.85	18.39	18.27	16.67	15.10	12.92
Threonine	5.96	4.50	5.31	5.80	6.07	4.51	6.36	9.70
Serine	2.99	4.05	4.58	4.81	5.64	5.09	4.72	8.71
Glutamic acid	12.36	9.45	8.95	8.93	7.86	13.15	12.15	10.25
Proline	1.35	2.11	2.16	2.23	2.30	1.41	1.93	4.56
Glycine	2.96	1.78	2.99	2.90	3.34	2.69	4.10	3.50
Alanine	1.94	1.32	1.85	1.61	1.74	2.00	2.38	1.26
Half-cystine	0.66	0.68	0.79	0.74	0.62	0.74	0.81	0.70
Valine	4.93	5.66	6.50	5.87	5.63	4.13	4.36	2.46
Methionine	0.96	3.52	3.20	3.60	3.72	1.07	0.45	1.16
Isoleucine	4.11	3.53	4.09	4.02	3.38	6.00	4.30	7.52
Leucine	9.78	6.86	6.54	6.13	6.58	9.25	10.08	8.22
Tyrosine	10.63	11.50	9.80	10.27	10.34	7.23	9.79	6.77
Phenylalanine	4.31	6.23	5.35	5.25	5.40	4.76	4.47	4.76
Tryptophan	1.46	0.95	0.99	0.84	—	0.62	1.51	2.00
Amide NH ₂	1.80	1.66	1.71	1.62	1.12	1.71	1.66	0.74

Los valores expresados corresponden a los siguientes autores:

EEA: SCHANTZ et al., 1972; EEB, BERGDOLL et al., 1955; EEC1 y EEC2: HUANG et al., 1967; EEC3: REISER et al., 1921; EED: CHANG y BERGDOLL, 1979; EEE: BORJA et al. 1972; EEF: REISER et al., 1981.

elipsoidales. La estructura parece ser esencial para la actividad biológica y la pérdida de toxicidad está íntimamente relacionada con la reacción antígeno-anticuerpo. La pérdida de los grupos atípicos ocultos inducen una alteración en la conformación de la molécula.

En la tabla 12 se ofrece la composición aminoacídica de las enterotoxinas. Las diferencias, tanto cualitativas como cuantitativas, entre los aminoácidos se manifiesta en las variaciones entre los puntos isoelectrónicos y entre los centros antigénicos (BERGDOLL et al., 1974), desconociéndose si éstas poseen algún significado aparte de representar determinantes antigénicos diferentes. Contienen cantidades relativamente elevadas de lisina, ácidos aspártico y glutámico y tirosina, pero, por el contrario, el contenido en triptófano es bajo. Un hecho repetitivo es que poseen sólo dos restos de cisteína, entre los que se establece un puente disulfuro.

La composición aminoacídica es muy similar entre la EEA y la EEE por un lado, y la EEB y las EECs por otro. El contenido en metionina (una a dos moléculas en el primer caso y ocho o nueve en el segundo) es el que ha permitido establecer estos dos grupos; pero ambos se diferencian también en la cantidad de lisina, ácidos aspártico y glutámico, leucina y triptófano. BERGDOLL et al. (1973) opinan que también parecen apreciarse diferencias en el comportamiento físico, ya que la actividad de las EEB o EECs quedan disminuidas o anuladas por

Tabla 11: Algunas propiedades de las enterotoxinas (tomado de BERGDOLL, 1983).

	EEA	EEB	EEC ₁	EEC ₂	EEC ₃	EED	EEE
Dosis emética (ED ₅₀) (ug/mono)	5	5	5	5-10	5-10	20	10
Peso molecular	27.800	28.366	26.000	26.000	28.900	27.3000	29.600
Punto isoeléctrico	7.3	8.6	8.6	7.0	7.9	7.4	7.0
Absorción máxima (mu)	277	277	277	277	277	278	277
Extinción (E ₁ ^{1%} _{1cm})	14.6	14.4	12.1	12.1	12.1	10.8	12.5

EEA: SCHANTZ et al., 1972; EEB: BERGDOLL et al., 1965; EEC₁: BORJA y BERGDOLL, 1967
 EEC₂: AVENA y BERGDOLL, 1967; EEC₃: REISER et al., 1979; EED: CHANG y BERGDOLL,
 1979; EEE: BORJA et al., 1972.

diversos factores tales como sales potásicas, acriflavina, sulfato de estreptomicina y cloranfenicol, entre otros. Al parecer, la EED no puede integrarse en ninguno de los dos grupos, formando otro aparte.

Es interesante remarcar que el resto N-terminal en todas las enterotoxinas es bien serina o bien ácido glutámico (tabla 13), siendo la serina el segundo resto en este último caso. Sólo se pueden proponer hipótesis en este terreno: BERKELEY et al. (1978) han sugerido que la secreción de enterotoxina pudiera llevarse a cabo a través de un sistema intermediario lipídico/exoproteína, en el cual la serina jugaría un papel crucial.

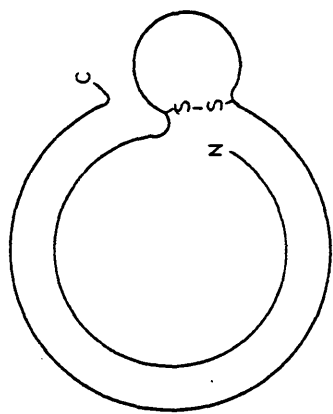
Tabla 13: Aminoácidos terminales de las enterotoxinas.

EET	N-terminal	C-terminal	Autor
A	Serina	Serina	SCHANTZ et al., 1972
B	Acido glutámico	Lisina	BERGDOLL et al., 1965
C1	Acido glutámico	Glicina	HUANG et al., 1967
C2	Acido glutámico	Glicina	HUANG et al., 1967
C3	Serina	-	REISER et al., 1979
D	Serina	Lisina	CHANG y BERGDOLL, 1979
E	Serina	Treonina	BORJA et al., 1972

La secuencia de la enterotoxina B revela que los dos restos

de cisteína se localizan en las posiciones 92 y 112; en la molécula activa se presentan en forma de cistina, estableciéndose un puente disulfuro entre ambos y formándose así un lazo ("lazo de la cistina") que engloba 20 aminoácidos y que le confiere una estructura muy estable, formando un enrollamiento (figura 11). Haciendo uso de tratamientos tripticos suaves se puede fragmentar este lazo entre los aminoácidos Lys y Thr que ocupan las posiciones 97 y 98 (SPERO et al., 1973). Incluso por la reducción del puente disulfuro, los dos fragmentos peptídicos permanecían juntos como una entidad molecular única, unidos mediante interacciones no covalentes. En apariencia, no hubo disminución de la actividad tanto tóxica como inmunológica. Era difícil obtener las dos partes como dos entidades independientes, y cuando se consiguió, mediante cromatografía con CM-celulosa en urea 8M, se comprobó que en esa forma eran muy inestables. Cada fragmento peptídico, pero especialmente el extremo N-terminal, reaccionaba con el anticuerpo específico para EEB. El péptido C-terminal inhibía la precipitación de la EEB con su anticuerpo específico pero generalmente no daba una línea de precipitación en las pruebas de difusión en gel, lo que fundamentaba que los determinantes principales pudieran estar relacionados con el extremo N-terminal. Existía cierta evidencia de que el péptido C-terminal pudiera ser tóxico, aunque a niveles muy bajos, posiblemente a causa de la fácil desnaturalización de los componentes separados. En ausencia del agente desnaturalizador, se restablecía la unión entre ambos

Figura 11: Representación esquemática de la estructura de EEB



(tomado de NISKANEN, 1977)

fragmentos, recobrando la totalidad de la actividad tanto tóxica como inmunológica (SPERO et al., 1973).

A.2.2. LOCALIZACION MOLECULAR DEL CARACTER DE ENTEROTOXIGENICIDAD.

Parece ser que el lazo de la cistina es una estructura compartida por todas las enterotoxinas, ya que cada una contiene tan sólo dos residuos de cisteína. Sin embargo, la secuencia aminoacídica de dicho lazo puede ser diferente para cada enterotoxina, como se ha entrevisto a partir de la secuenciación provisional del mismo en la EEA. El lazo de cistina en la EEC1 puede fragmentarse de igual manera que en la EEB, pero la EEA es absolutamente resistente a esta práctica (SPERO et al., 1973), lo que sugiere que no es necesaria la escisión para que ejerza su acción tóxica.

Al parecer, el lazo de cistina en las EEB y EEC1 son similares pero no idénticos, ya que en esta última el enlace que se escindió correspondía a Lys-Val y en EEB no se ha evidenciado ningún par que incluya estos dos aminoácidos.

Hasta la fecha, los datos recogidos permiten enunciar la secuencia del lazo de la cistina en EEA y EEB, analizando aquellas porciones que sean idénticas (BERGDOLL, 1983).

EEA:

-Thr-Ala-Cys-Met-Tyr-Gly-Gly-Val-Thr-Leu-His-Asp-Asn-Asn-Arg-
Leu-Thr-Glu-Glu-Lys-

EEB:

-Lys-Thr-Cys-Met-Tyr-Gly-Gly-Val-Thr-Gly-His-Gly-Asn-Asn-Glu-
Leu-Asp-Lys-Tyr-Tyr-

HUANG et al. (1975) han propuesto éste como centro tóxico ya que es la única zona de la molécula idéntica en ambas enterotoxinas.

A.2.3. EFECTOS DE LAS MODIFICACIONES QUIMICAS

Numerosos autores han destacado la estabilidad de la molécula de EEB (SCHANTZ et al., 1965; DALIDOWICZ et al., 1966; CHU et al., 1969; SPERO et al., 1971), quienes ensayaron el tratamiento con varias sustancias químicas, así como la desnaturalización proteica y la reactivación. Se han realizado estudios para sustituir restos en la enterotoxina A en el área de la secuencia común, a fin de demostrar que ésta es la responsable de la acción tóxica. En un principio se concentraron los esfuerzos en la sustitución de los restos de metionina, pero resultaron infructuosos, probablemente por ser inaccesibles. Posteriormente se intentó con la histidina, observándose que la sustitución de cinco o seis de los siete restos inactiva la enterotoxina, aunque se puedan reemplazar

al menos tres de ellos sin perjuicio para la toxicidad; desafortunadamente, no ha sido posible determinar cuál de los restos estaba implicado en la actividad tóxica.

La acetilación de las enterotoxinas B y C con acetil-imidazol y el tratamiento nitrificante con tetranitrometano reveló la presencia de cinco o seis restos tirosílicos "libres" (CHU, 1968; BORJA, 1969; BORJA y BERGDOLL, 1969). Estas modificaciones apenas repercuten sobre las propiedades inmunológicas o tóxicas de la molécula de enterotoxina. Al utilizar urea 8M, el resultado fue la acetilación de diez residuos de tirosina, inhibiéndose la reacción antígeno-anticuerpo aproximadamente en un 20%. Al ser sometidas a clorhidrato de guanidina 5M las enterotoxinas experimentaban un desdoblamiento marcado, siendo expresado en un cambio en la viscosidad intrínseca y en la acetilación de los restos de tirosina, que cuando ésta es completa se pierde la toxicidad casi en su totalidad. Los grupos tirosílicos "anormales" pueden jugar un papel importante en las características estructurales de la toxina, tales como la interacción con otras cadenas laterales con el objeto de formar un núcleo interno para mantener la estructura rígida, ya que se observaron cambios conformacionales a pH 11.5, pH al que la disociación de la tirosina es dependiente del tiempo. Por lo tanto, el hecho de que la conformación original se altere con detrimento de la actividad biológica viene a demostrar que, al igual que otras proteínas, la estructura terciaria debe ser fundamental para que esté

activa.

La modificación de los restos de metionina de la EEB con ácido iodoacético y H_2O_2 (CHU y BERGDOLL, 1969) reveló que cuatro de los ocho restos reaccionaban a una velocidad superior que los restantes. Los análisis inmunoquímicos y fluorométricos de la toxina modificada indicaban un cambio en la conformación cuando se variaban más de seis residuos de metionina. La actividad emética de la toxina se perdía igualmente cuando reaccionaban seis de estos restos.

CHU y CRARY (1969) mediante glicina metil éster en presencia de carbodiimida y de clorhidrato de guanidina 6M consiguieron la modificación de los 33 grupos carboxílicos de EEB. Observaron que la pérdida de actividad emética sólo era efectiva cuando se modificaban 30 ó más grupos, que implicaba así mismo la expansión de la molécula. Cuando la modificación se efectuaba en 21 ó 24 restos sólo se observaba una ligera disminución de la reacción antígeno-anticuerpo y de las propiedades fluorescentes.

La guanidación de los grupos ϵ -amino y del 30% de los restos N-terminales libres no supuso ningún cambio importante en la conformación o en la actividad biológica, aunque la solubilidad de la enterotoxina EEB disminuyó radicalmente. SPERO et al. (1971) concluyeron que los restos de lisina no estaban implicados ni en los centros antigénicos ni en los tóxicos. Estos mismos autores, al igual que CHU et al. (1969)

observaron que la eliminación de los grupos ϵ -amino o la neutralización de las cargas positivas por acetilación produce la inactivación de la toxina. De sus experiencias también parece deducirse que las cargas positivas son esenciales para mantener la conformación y la actividad de la toxina. Aunque CHU et al. (1969) sugirieron que los grupos amino pueden jugar un papel en la actividad emética y en la reacción antígeno-anticuerpo, es más verosímil que su función principal esté encaminada a mantener la conformación nativa, que es esencial para que tenga lugar la actividad biológica.

En la composición de la EEC destacan muchos aminoácidos polares, así como dos restos de triptófano. La modificación de los aminoácidos libres no afecta la actividad de esta enterotoxina, pero la metionina parece desempeñar un importante papel (CHU y BERGDOLL, 1969; CHU y CRARY, 1969). La modificación de los grupos carboxil libres induce un leve efecto sobre la reacción antígeno-anticuerpo y sobre la fluorescencia, pero la actividad emética no se ve afectada. La conformación de la EEB experimenta cambios a medida que se va modificando y, en opinión de dichos autores, no puede volver al estado nativo tras la modificación.

BORJA y BERGDOLL (1969) estimaron que la molécula de EEC es compacta, pero que se desdoblaba tras el tratamiento con clorhidrato de guanidina, transformándose en linear. En dicho estudio se concluyó que los cinco grupos tirosil libres de la superficie no afectan a las propiedades inmunológicas ni

eméticas de la EEC.

A.3. SINTESIS DE LAS ENTEROTOXINAS

A.3.1. GENETICA Y MECANISMO DE SINTESIS

A.3.2. LOCALIZACION CELULAR DE LA SINTESIS Y TRANSPORTE EXTRACELULAR

A.3.3. FASE DE CRECIMIENTO

A.3.4. FACTORES QUE AFECTAN A LA SINTESIS DE LAS ENTEROTOXINAS

A.3.4.a. SUSTANCIAS EN SOLUCION

A.3.4.b. TEMPERATURA

A.3.4.c. TIEMPO

A.3.4.d. ATMOSFERA Y EMPAQUETADO

A.3.4.e. pH

A.3.4.f. ACTIVIDAD DE AGUA

A.3.4.g. CLORURO SODICO

A.3.4.h. NITRATOS Y NITRITOS

A.3.4.i. FLORA COMPETIDORA

A.3.5. DIFERENCIAS ENTRE LA SINTESIS DE LAS ENTEROTOXINAS

A.3.1. GENETICA Y MECANISMO DE SINTESIS

¿Cuál es la función de las enterotoxinas en la biología de los estafilococos? Aquellas cepas enterotoxigénicas, ¿pueden

mutar y perder este carácter, perdurando su viabilidad? Son muchas las preguntas que aún no se han respondido en torno a la síntesis de las enterotoxinas estafilocócicas, preguntas que fueron surgiendo desde la década de los 40.

En la actualidad se acepta que la EEA se codifica por un gen en el cromosoma, que es transferible al genoma de E. coli en forma de plásmido. Por el contrario, el gen que codifica la EEB parece que reside en un plásmido, aunque sería verosímil que estén implicados dos genes. Demos un breve repaso a cómo se formularon estas hipótesis acerca de la base genética de la producción de enterotoxinas.

La EEB se ha estudiado más exhaustivamente que cualquier otra enterotoxina estafilocócica, probablemente a causa de que su producción posee la característica de ser más variable. Incluso se ha observado el hecho de que individuos de una misma colonia sintetizan cantidades muy diferentes de EEB (BERGDOLL et al., 1974). ALTENBERN (1975) ha indicado que obtuvo mutantes de las cepas 778 y 14458 que producían incluso 50 veces más que la cepa parental por selección de individuos sensibles al pH seguido de mutantes de carbohidratos. Sin embargo, la EEA permanece invariable en cuanto a la cantidad producida, siendo difícil en extremo incrementar el rendimiento (BERGDOLL et al., 1974).

DORNBUSCH et al. (1969) anunciaron la relación existente entre la resistencia a la meticilina y la producción de EEB.

No obstante, LACEY (1974) probó que el gen mec, responsable de la primera característica, no está ligado a entB, como se denominó al gen que codifica la síntesis de EEB. De hecho, el 80% de las cepas examinadas por BERGDOLL et al. (1974) que presentaban resistencia a la meticilina producían EEB mientras que tan sólo el 17% de meticilín-sensibles eran productores. Esto implica que la EEB se relacione principalmente con las infecciones de tipo hospitalario, mientras que las EEA y EEC son las que se asocian más comúnmente con brotes de intoxicación alimentaria.

Posteriormente, SHAFER y IANDOLO (1978), estudiando la síntesis de esta misma enterotoxina por la cepa S4, hallaron un único plásmido de 37S que codificaba la resistencia al Cadmio, intentando relacionarlo con la producción de EEB. Sin embargo, la eliminación del plásmido determinaba la aparición de individuos cadmio-negativos pero EEB+. La cepa 277 posee dos plásmidos: uno 37S, presente en las estirpes penicilín-resistentes pero cuya eliminación también resultaba en penicilín-sensibles/EEB+; el otro era 21S y codificaba la característica Tet-r (tetraciclin-resistente). Dichos autores sugirieron, considerando los datos mencionados, que la EEB estaba codificada por un gen localizado en el cromosoma.

SHALITA et al. (1977), en Israel, analizaron la dotación genética de la cepa DU4916 por métodos de transducción, transformación y por eliminación de porciones genómicas, informando que el plásmido pSN2, de 0.75 Mdaltón codificaba

la síntesis de EEB en esta cepa, estando ligado al plásmido de resistencia a la tetraciclina, mientras que la resistencia a la metilicina seguía un patrón independiente.

El siguiente año SHAFER y IANDOLO (1979), cuando analizaban 16 cepas metilicín-resistentes, observaron que un tercio de las mismas presentaba un plásmido (entB) de 1.15 Mdalton, al parecer crítico para la enterotoxigenesis de EEB, aunque no suficiente. Ese mismo gen se localizaba en el cromosoma de cepas metilicín tanto resistentes como sensibles. La hipótesis que se barajó en el momento fue que los loci de entB y de met-r no están relacionados íntimamente pero que cotransducen con alta frecuencia. Así mismo, met-r y tet-r siempre son cotransducidos.. Los datos apuntaban hacia la asociación temporal entre entB, met-r y tet-r.

A este respecto, PATEE y GLATZ (1980), en Ames (Iowa) sugirieron que el gen que codifica la síntesis de EEB en las cepas S6 y 243 se localiza en un transposón. Los últimos datos (DYER y IANDOLO, 1981), confirmados por técnicas de transformación y por protoplastos, parecen indicar que el gen pSN2 identificado por SHALITA et al. (1977), que codifica un polipéptido de 18.000 dalton que no reacciona inmunológicamente con los anticuerpos específicos frente a EEB, no es un reservorio del gen estructural de EEB, pero sus funciones en relación con la síntesis de esta enterotoxina son de naturaleza regulatoria. En las cepas productoras de EEB, por tanto, pSN2 podría localizarse tanto en el material

genético extracromosómico como cromosómico, pero no actuaría directamente sobre la síntesis de la enterotoxina, para la que sería necesario pero no suficiente. Esta estaría sujeta al menos a dos genes independientes.

La cotransducción de un mutante deficiente en la síntesis de EEB por recombinación sólo tenía lugar cuando el donante albergaba el plásmido pentB. La EEB de los genotipos cromosómicos no pudo establecerse en dichos hospedadores. Estos datos sugieren que el gen entB no es capaz de presentar una frecuencia elevada de translocación (SHAFFER y IANDOLO, 1980).

Las informaciones habidas sobre la base genética de la síntesis de EEA son mucho más escasas y dispersas. Los primeros datos se remontan a 1965, y son obra de CASMAN (1965) quien confirmó a cepas no enterotoxigénicas este carácter por lisogenia con fagos temperados de cultivos enterotoxigénicos. En 1980, PATEE y GLATZ (1980) determinaron que en S6, el gen responsable de la síntesis de EEA se localizaba cercano al de la α -hemolisina, hla+, entre pur-110 e ilv-129, en el cromosoma, pero sin embargo, en 196E no estaba en la misma posición.

Lo que se conoce sobre otras enterotoxinas es aún más exiguo. IANDOLO y DYER (1981) sugirieron que el entC no estaba asociado a DNA plasmídico, por lo que el gen sería también cromosómico.

A.3.2. LOCALIZACION CELULAR DE LA SINTESIS Y TRANSPORTE EXTRACELULAR.

La producción de proteínas extracelulares, tales como las enterotoxinas estafilocócicas, implica dos procesos: la síntesis y la secreción. Los mecanismos de esta segunda etapa permanecen oscuros, no habiéndose demostrado de forma inequívoca, aunque generalmente se cree que los mecanismos de transporte de la bacteria son similares a los que tienen lugar en las células eucariotas. En ambos casos, las proteínas destinadas a la secreción se sintetizan con una prolongación N-terminal, generalmente de 25 a 30 aminoácidos, que juega algún papel en el paso de la proteína a través de la membrana. Este péptido accesorio o "secuencia directriz" se escinde de la proteína mediante una proteasa que actúa en la superficie externa de la membrana, liberándose la proteína al medio extracelular.

Hay muchos datos que apuntan que las enterotoxinas se localizan cierto periodo de tiempo en la membrana. A este respecto cabe mencionar los estudios de FRIEDMAN (1968) quien observó que una serie de sustancias (Tween 80, ácido oleico, deoxicolato sódico, penicilina, D-cicloserina, bacitracina) inhibían la síntesis de EEB sin afectar el crecimiento. Esto se ha interpretado como que la EEB permanece asociada a la superficie celular, ya que la actividad de estos compuestos

se dirige no hacia la proteína sino específicamente frente a los productos celulares que se originan cerca de la pared, por lo que el lugar de síntesis de EEB debe estar localizado en la superficie externa.

Las sustancias con capacidad tensoactiva pueden modificar bien exclusivamente la síntesis de enterotoxinas o bien el crecimiento de los estafilococos. MARKUS y SILVERMAN (1970) realizaron un estudio muy completo sobre la acción de diversos compuestos surfactantes sobre ambos parámetros, observando que el Tween 60 incrementaba mucho la síntesis tanto de EEA como de EEB, apenas modificando el crecimiento. Otras sustancias (Span 80) actuaban inhibiendo la secreción y otras, como el Triton X-100 o el monopalmitato, anulaban el crecimiento. Estos datos se complementan con lo anteriormente expuesto y ponen de manifiesto la importancia de la integridad funcional de la superficie celular en la secreción de las enterotoxinas estafilocócicas. PEPPER et al. (1981), tras sus observaciones sobre la inhibición de la secreción de EEA por células tratadas con cerulenina, sugirieron que se producían cambios en la composición de la membrana que afectan de forma específica al proceso de transporte, posiblemente por la alteración en la fluidez de la membrana.

Posteriormente, CZOP y BERGDOLL (1970) indicaron que las formas L (obtenidas por tratamiento prolongado con penicilina y metecilina y que sólo crecen en medios hipertónicos, a diferencia de los "revertientes" que pueden crecer en medios

isotónicos) pueden producir EEA, pero que existía una relación entre EEC y EEB y la superficie celular. Sus datos implicaban que todas las formas "revertientes" y 5 de 6 formas L de cepas productoras de EEA secretaban esta enterotoxina al medio, mientras que los datos respectivos para las productoras de EEB eran 4 de 5 "revertiente" y ninguna forma L. De igual forma, ningún "revertiente" y ninguna forma L cuyas cepas parentales producían EEC secretó dicha enterotoxina.

MILLER y FUNG (1975) determinaron que la mayoría de la enterotoxina intracelular se situaba en el espacio periplásmico en todas las fases de crecimiento, incrementándose la cantidad total de la misma cuando se detectaba toxina extracelular en el medio de cultivo. En 1977, NISKANEN (1977), por la ruptura de las células de *S. aureus* con presión a -30°C observó que no se podía evidenciar EEA ligada a la membrana celular; así mismo, fue incapaz de demostrar la liberación de enterotoxina por células que no se hallaban en replicación, lo que hacía suponer que la síntesis de EEA estaba muy relacionada con el crecimiento. Sin embargo, anteriormente MARKUS y SILVERMAN (1970) habían puesto de manifiesto la secreción por parte de células no replicantes, por un sistema mediante el cual retiraban células de la última parte de la fase exponencial y primera de la estacionaria, inhibiéndose la secreción por 2,4-dinitrofenol (inhibidor de la respiración celular, lo que hacía suponer que el proceso exigía energía), pero no por

estreptomycin o por penicilina G. Incluso probaron que estas células podían sintetizar cierta cantidad de toxina en ausencia de una fuente exógena de nitrógeno, y sólo con glucosa, en presencia de cloranfenicol, un inhibidor de la síntesis proteica, indicando así la existencia de precursores de toxina en la célula. Ya que las variantes de fase L pueden sintetizar enterotoxina (CZOP y BERGDOLL, 1970) parece posible que la síntesis tenga lugar en el medio intracelular sólo en los periodos de crecimiento del microorganismo. También se admite que la enterotoxina sintetizada se secreta rápidamente al medio, de forma que no tenga lugar el acúmulo masivo de enterotoxina en el contenido intracelular.

Los datos que se sucedieron a continuación provinieron del grupo de Kansas. TWETEN y IANDOLO (1981) demostraron la presencia de un precursor de EEB ligado a la membrana. Este era inmunorreactivo, formando líneas de identidad completa con la EEB aunque la movilidad electroforética era diferente a la de la EEB extracelular. Por técnicas de SDS-PAGE y transfiriéndolo a continuación a membranas de nitrocelulosa comprobaron la presencia de una banda para este precursor, cuyo peso molecular sería 3.500 dalton superior al de EEB extracelular. El mapa peptídico demostró que los péptidos tripticos eran idénticos a los de la enterotoxina pero aparecían siete nuevos picos. No obstante, esto sugiere una homología de la secuencia pero no prueba la identidad. Este precursor sólo lo presentaban las cepas EEB+. Dos años después se confirmaron estos datos (TWETEN y IANDOLO, 1983).

Este precursor de EEB (pEEB) es resistente a la proteasa y a la extracción con soluciones salinas concentradas y diluidas a 0 y a 20, pero sin embargo se libera por lisostafina. Representaría el precursor genético de EEB extracelular, sugiriéndose que la EEB de reciente formación pudiera ser secuestrada temporalmente antes de liberarse en regiones especializadas que requieren una integridad estructural de la pared.

A.3.3. FASE DE CRECIMIENTO

Los datos apuntaban que la EEA se sintetizaba en la fase exponencial del crecimiento, mientras que la EEB en la estacionaria (MCLEAN et al., 1968; MORSE et al., 1969; MARKUS y SILVERMAN, 1970). WU y BERGDOLL (1971) indicaron que en un medio sintético la producción de EEB mantenía el mismo ritmo que el crecimiento hasta que tenía lugar la deplección de varios aminoácidos. Por otro lado, CZOP (1972) demostró que en la cepa S6, la EEB era sintetizada a todo lo largo del ciclo, si bien al principio no era detectable por la técnica de difusión sencilla en gel de agar, por la que se había venido haciendo anteriormente. La EEA y la EEB mantenían un ritmo de producción diferente en la fase exponencial: la velocidad de síntesis en EEB era de 11 minutos hasta la hora 12 ó 13, cuando la población pasaba de 2×10^9 a 4×10^9 y la EEB producida de 4 a 15 $\mu\text{g/ml}$; por el contrario, el ritmo de producción de EEA alcanzaba un equilibrio entre las horas 11

y 12, pasando la población de 3.3×10^8 a 1.9×10^9 , y la cantidad de EEA registrada de 3.5×10^{-3} a 1.6×10^{-2} $\mu\text{g/ml}$. En la cepa 100 y según dicha investigadora, la síntesis de EEA siempre tenía lugar a la misma velocidad que el ritmo de crecimiento, reduciéndose cuando éste descendía, pero continuando durante la fase transitoria a igual ritmo que el crecimiento.

De lo anteriormente expuesto se deduce que tanto la EEA como la EEB son metabolitos primarios que se producen en todas las fases del crecimiento.

A.3.4. FACTORES QUE AFECTAN A LA SÍNTESIS DE LAS ENTEROTOXINAS

A.3.4.a. SUSTANCIAS EN SOLUCIÓN

MORSE et al. (1969) sugirieron que la síntesis de EEB estaba regulada por represión catabólica, ya que el ritmo diferencial de síntesis de la toxina decrecía cuando la glucosa se hallaba presente, y la adición de este carbohidrato a medios donde se sintetizaba toxina de forma activa producía una represión inmediata de la misma (MORSE y BALDWIN, 1971). Este fenómeno podía en parte ser explicado por el descenso en el pH debido al catabolismo de la glucosa pero no podía encontrar en este hecho su justificación plena. La disminución del ritmo diferencial de síntesis de toxina

fue superior a pH 7.7 que a pH 6.0. La represión de la síntesis de toxina también se vio fomentada por aquellas condiciones que favorecían la decarboxilación oxidativa del piruvato (MORSE y BALDWIN, 1971). Ya que el piruvato es un catabolito de la glucosa todo hacía suponer que se debía a un control catabólico, dependiendo la represión de reacciones asociadas a la decarboxilación del piruvato. El choque anaeróbico, que inhibía la decarboxilación oxidativa del piruvato, podía invertir la represión, al convertirse la glucosa en ácido láctico principalmente, siendo metabolizado de forma más rápida a fin de equiparar la energía obtenida por las rutas aeróbicas, mientras que la adición de un aceptor de electrones sustitutivo (NO_3^-) evitaba este fenómeno, permitiendo la decarboxilación (MORSE y MAH, 1973). Esta represión por la glucosa y el ion piruvato se anulaba total o parcialmente por la eliminación de tiamina del medio (MORSE y BALDWIN, 1971). En ausencia de una fuente añadida de energía, la eliminación de esta vitamina del medio provocaba un descenso en la síntesis proteica pero un incremento del ritmo diferencial de síntesis de toxina. En ausencia de tiamina, el piruvato no se metabolizaba, pero se originaba de igual forma el descenso en el ritmo de síntesis proteica. Por lo tanto, las condiciones que alteraban la decarboxilación oxidativa del piruvato o que deprimían el ritmo de síntesis proteica incrementaban el ritmo de síntesis de EEB.

En contraposición a estos datos, METZGER et al. (1973) propusieron un medio compuesto por N-Z Amino A, 1% de

extracto de levadura y 0.2% de glucosa en el que la eliminación de esta última determinaba una disminución de EEB del 40%.

En opinión de IANDOLO y SHAFER (1977) la regulación de la síntesis de EEB había de ser más compleja que una mera represión catabólica. El uso de dos análogos de la glucosa, alfa-metil glucósido (AMG) y 2-deoxiglucosa (2-DOG), que se demostraron que inducían una marcada represión de la síntesis de beta-galactosidasa por E. coli, producían el efecto contrario en la cepa S6. El primero parece estimular la síntesis de EEB y de otras proteínas extracelulares, mientras que el segundo inhibe radicalmente la síntesis de EEB en una forma muy específica. Estos efectos son especialmente confusos, ya que, aunque ambos son absorbidos por la célula, ninguno parece ser metabolizado. Los hallazgos de que la inhibición producida por 2-DOG, aunque posee cierto grado de reversibilidad, parece ser más bien permanente que transitoria, y que no se invierte por la incorporación de AMPc (lo que sí ocurre en el caso mencionado de E. coli), así como que la adición de glucosa no restablece la síntesis de EEB cuando se halla 2-DOG presente en el medio, pero sí que permite la producción de nucleasa estafilocócica, discrepar con aquellos generalmente asociados con las enzimas controladas por catabolitos.

Los aminoácidos imprescindibles para el crecimiento y la producción de enterotoxinas han sido estudiados de forma

exhaustiva. MAH et al. (1967) describieron un medio sintético para el crecimiento de la cepa S6, compuesto por sales inorgánicas, 11 aminoácidos (glicina, valina, leucina, treonina, fenilalanina, tirosina, cisteína, metionina, prolina, arginina e histidina), y por tres vitaminas (tiamina, ácido nicotínico y biotina). Aunque el crecimiento fue similar, la producción de EEB correspondió al 14% comparada con un medio complejo. El número mínimo de sustancias que permitía la síntesis de enterotoxinas fue de tres aminoácidos (arginina, cistina y fenilalanina), seis sales inorgánicas y cuatro vitaminas, siendo la fuente de energía glutamato monosódico (BERGDOLL et al., 1974). Aparentemente, el factor limitante para el crecimiento y la síntesis de enterotoxinas era la biosíntesis de uno o más aminoácidos ausentes, más que la concentración de aminoácidos presentes en el medio (MILLER y FUNG, 1973). La cantidad de enterotoxina producida por S6 fue de 5-6 µg/ml. En estos experimentos se observó que cuando la fuente de energía era la glucosa se hacía necesario adicionar prolina y valina.

Los primeros experimentos realizados con medios sintéticos para determinar los requisitos mínimos para la síntesis de enterotoxinas se deben a SURGALLA (1947), con cepas productoras de EEA. Demostró que era posible la producción de EEA en un medio compuesto por cistina, arginina, glicina y sulfato amónico más tres vitaminas, tres sales y glucosa como fuente de energía. De todos estos datos se deduce que tanto la arginina como la cistina son esenciales.

WU y BERGDOLL (1971) al analizar 18 aminoácidos diferentes concluyeron que se utilizaban siete de ellos en mucha mayor medida que los restantes: serina y treonina eran empleados muy rápidamente, seguidos de glicina y de prolina. La arginina no se utilizaba en grandes cantidades pero era esencial al menos para iniciar el crecimiento y la síntesis. En apariencia, la producción cesaba cuando desaparecía la arginina del medio. Otras experiencias han demostrado que la adición al medio de serina, arginina o treonina de forma independiente puede llegar a inhibir tanto el crecimiento como la síntesis, pero la adición conjunta estimula esta última hasta casi el doble. Parece muy posible que la llamada "represión catabólica" de la producción de enterotoxina sea un efecto indirecto al reprimir alguna vía metabólica conectada con la síntesis de la enterotoxina. Se sabe que existen tres rutas metabólicas para el catabolismo de la treonina, estando representadas por cada uno de estos tres aminoácidos. Ya que la prolina es esencial en el medio mínimo cuando la glucosa se utiliza como fuente de carbono pudiera ser que la vía metabólica que implica tanto este aminoácido como la arginina se bloquee, y que la síntesis de enterotoxina se ligue en cierta forma a esta ruta.

KELLER et al. (1978), en un esfuerzo por determinar la relación entre la producción de EEB y el catabolismo de los aminoácidos que pudieran ser utilizados como fuente de energía concluyeron que S. aureus S6 era capaz de hacer uso de

ácido glutámico, prolina, histidina, ácido aspártico, alanina, treonina, serina o glicina como fuentes principales de energía, cuando éstos se añadían de forma independiente a la concentración de 2.5 g/l a un medio base que contenía sales, vitaminas y 30 mg de 18 aminoácidos diferentes por litro.

Cuando desarrollaron un medio mínimo definido para el crecimiento y producción de EEB por *S. aureus* S6, MILLER y FUNG (1973) observaron que, a la vez que glutamato monosódico como fuente de carbono, nitrógeno y de energía, éste había de contener arginina, cistina y fenilalanina.

Se ha demostrado que al incrementar el nivel de magnesio de 0.4 a 1.5 mM en un medio conteniendo sólo aminoácidos (2.08%), sales y vitaminas e inoculado con *S. aureus* S6, la síntesis de EEB se incrementaba aproximadamente el 80% (KELLER et al., 1978b). Así mismo se determinó que disminuyendo el nivel de fosfatos a 1/10 (a 2.87mM) ni la secreción ni el crecimiento resultaban afectados. El nivel óptimo de potasio quedó establecido entre 15 y 45 mM, siendo consideradas las sales de amonio no esenciales en el medio de aminoácidos.

A.3.4.b. TEMPERATURA

La temperatura de incubación afecta tanto a la fase de latencia como a la velocidad de crecimiento de los

microorganismos, no guardando relación el tamaño del inóculo con la extensión de la fase de latencia en ninguna temperatura. La temperatura óptima de crecimiento del *S. aureus* es de 30-37°C, si bien, pueden crecer entre 4 y 45.4°C (D'ARCA SIMONETTI, 1975). Los estudios de producción de enterotoxina se han realizado casi todos a 37°C, pero parece probable que el óptimo para la producción de EEB y de EEC sea de 40°C, al menos en medios líquidos (VANDENBOSCH et al., 1973), mientras que para EEA se ha establecido en 42°C. En opinión de BERGDOLL et al. (BERGDOLL et al., 1974) la temperatura óptima de producción de las enterotoxinas es de 40°C y por encima o por debajo de ésta se ve drásticamente reducida la síntesis, no pudiéndose observar a temperaturas superiores a 45°C o inferiores a 20°C.

Precisamente en estudios realizados con la cepa 196E se determinó que entre 33 y 40 grados hay un incremento notorio de la EEA secretada al medio, que se acentúa a los 42°C, mientras que a 45°C se detectaba poca EEA y a 45.5°C la presencia era nula (NISKANEN, 1977). En este mismo estudio se comprobó que la TNAsa exhibía un óptimo de producción entre 27 y 33°C, y que la cantidad iba disminuyendo según la temperatura se aproximaba a 45°C. A temperaturas superiores a las de crecimiento no se podía evidenciar la presencia de EEA aunque sí de TNAsa. De los estudios llevados a cabo por SCHEUSNER et al. (1973) se concluyó que a 7°C no se detectaba enterotoxina alguna, mientras que ya a 13°C se podía observar la presencia de EEA, EEB, EEC pero no de EED. En el rango

entre 19 y 39 °C se secretaban las cuatro enterotoxinas estudiadas, mientras que a 45 °C la cepa secretora de EEB había perdido esta capacidad y a 50 °C no se evidenciaba ninguna enterotoxina presente en el medio (BHI).

Con un inóculo de 10 microorganismos/ml D'ARCA SIMONETTI (D'ARCA SIMONETTI, 1975) evidenciaron por el "kitten test" en una de once estirpes la presencia de enterotoxina en cultivo en leche y en BHI tras 24 horas de incubación a 2 y a 4 °C. Transcurridos tres días se detectó en cuatro de las estirpes, y tras cinco días en cinco. Cuando el inóculo era de 10 microorganismos/ml, el tiempo mínimo requerido para la evidenciación de enterotoxina fue de 5 días a esta misma temperatura de 2 a 4 °C. A -2 °C ninguna cepa sintetizaba enterotoxina, pero en dos de ellas se entrevió una ligerísima producción de hemolisina tras cinco días. De todas formas, estos resultados no son extrapolables a lo que ocurriría en los alimentos, por no existir competencia microbiana, por la masividad del inóculo y por ser el sustrato muy favorable. Ciertos estudios realizados en queso, jamón y masa de camarones indican que a 44 °C la producción de EEB queda limitada, siendo el óptimo a 37 °C (HEIDELBAUER y MIDDLEAUGH, 1973).

A.3.4.c. TIEMPO

Hasta la fecha no está determinado de forma inequívoca el tiempo mínimo requerido para que la síntesis de enterotoxinas

en alimentos sea suficiente para originar intoxicaciones en la especie humana. Depende de los factores ambientales, de los específicos de la cepa y de la idiosincrasia propia de los sujetos. A 37°C, el puré de patatas con leche, sandwiches de jamón y pasta de gambas requieren para producir intoxicación en el hombre 6, 22 y 72 horas, respectivamente. NISKANEN (1977) detectó ya a las 6 h la presencia de EEA secretada al inocular la cepa 196E en BHI por la técnica de sacos de diálisis.

A.3.4.d. ATMOSFERA Y EMPAQUETADO

El efecto de la atmósfera en el crecimiento microbiano, especialmente en la superficie de los alimentos, es debida a la acción directa de los gases sobre los microorganismos y/o a cambios en el potencial de oxido-reducción de los alimentos. El empaquetado o almacenamiento de alimentos en una atmósfera controlada repercute sobre su longevidad.

Se han realizado varios estudios para correlacionar la síntesis de las enterotoxinas con la velocidad de agitación (KATO et al., 1966; DIETRICH et al., 1972). KATO et al. (1966) sugirieron que la velocidad óptima era de 280 rpm (6.0 µg/ml tras 24 h), mientras que a 210 y a 310 se producía 5.0 y 4.9 µg/ml, respectivamente. Igualmente, observaron una correspondencia entre el volumen del medio de cultivo y la síntesis de EEA, lo que también apuntaría hacia una aireación superior, por la relación superficie:volumen. De igual forma,

CARPENTER y SILVERMAN (1974) realizaron una serie de experimentos de los que dedujeron que la cantidad máxima de EEB se secretaba cuando la concentración de oxígeno disuelto en el medio era del 10%. Cuando esta cifra era del 100%, aun observándose un crecimiento boyante, no se pudo detectar toxina ni nucleasas. Concluyeron que el crecimiento de los estafilococos y la producción de toxinas y nucleasas por los mismos estaba controlado por el oxígeno disuelto más que por la velocidad de aireación.

STARK y MIDDLEAUGH (1970) estudiaron con distintas atmósferas en cuanto a CO_2 y N_2 se refería la correlación existente entre la fluorescencia específica por la presencia de EEB en la cepa 243 y S6 y la cantidad de enterotoxina secretada al medio. Según estos autores, la secreción de enterotoxina decrecía, pero no se anulaba, en concentraciones de CO_2 superiores a 25%, no existiendo una correlación positiva entre la fluorescencia celular y la producción de EEB. Por el contrario, en una atmósfera de N_2 , la síntesis de EEB se inhibía, no afectándose en absoluto la fluorescencia celular. En una experiencia similar, HEIDELBAUER y MIDDLEAUGH (1973) hallaron EEB por técnicas de fluorescencia en pasta de queso incubada a 37°C , pH 9.0, 2% de ClNa y 50% de CO_2 ó 50% N_2 , siendo imposible hacerlo por gel difusión en atmósfera del 100% N_2 . El efecto del nitrógeno sobre el crecimiento y la producción de enterotoxinas fue estudiado por BENNETT y AMOS (1982) en sandwiches empaquetados en atmósfera de N_2 detectando enterotoxina en los de embutido y de hamburguesa

tras 2 y 4 días, respectivamente, de incubación a 26°C, pero no se pudo constatar la presencia de la misma en los de pavo.

Diferentes investigadores han demostrado que las condiciones de anaerobiosis disminuyen e incluso anulan en su totalidad la producción de enterotoxinas estafilocócicas, tanto en medios de crecimiento sintéticos, como en alimentos (THATCHER et al., 1962; GENIGEORGIS et al., 1969; BARBER y DEIBEL, 1972). La falta de oxígeno favorece el desarrollo de los lactobacilos anaerobios facultativos competidores provocando la disminución subsiguiente de Staphylococcus y de Micrococcus (INGRAM, 1962). MORSE y MAH (1973) explicaron el efecto de la anaerobiosis sobre el mecanismo control de la producción de EEB, y tal como se expone en el apartado en el que se trata el tema de las sustancias en solución, obedece a un metabolismo oxidativo de la glucosa más rápido.

Se ha apreciado la síntesis de EEA en lonchas de bacon a 37°C, con una atmósfera del 5% de CO₂, O₂ y N₂ (THATCHER et al., 1962). BARBER y DEIBEL (1972) manifestaron haber detectado la producción de EEA en embutidos fermentados tras 24 h en atmósfera con el 10, 15 y 20% de oxígeno, pero no tras 120 h en ausencia absoluta de este elemento. En los embutidos objeto de estudio detectaron crecimiento en la periferia donde el potencial oxido-reducción era superior.

En el envasado al vacío, la fase gaseosa del alimento se modifica por el consumo de O₂ y acúmulo de CO₂.

Por lo anteriormente expuesto, se concluye que la conservación al vacío y con gas ejerce sólo una influencia limitada en la síntesis de enterotoxinas en los alimentos contaminados. No obstante, el empaquetado tiene gran importancia en los alimentos estériles, durante el transporte, la distribución y venta de los mismos.

A.3.4.e. VALOR pH

La influencia del pH depende de las diferentes cepas. En términos generales parece deducirse que las oscilaciones del mismo ejercen menos efecto sobre la producción de enterotoxina que sobre el crecimiento estafilocócico. La transcendencia de este parámetro sobre la síntesis de enterotoxinas se analiza más ampliamente en el apartado A.4. del capítulo III.

A.3.4.f. ACTIVIDAD DE AGUA

Representa un papel importante en la conservación de los alimentos secos y salados, en mermeladas y en aquellos productos que llevan gelatina en su composición. Los efectos que ejerce la actividad de agua en las diversas actividades celulares serán tratadas en el apartado A del capítulo IV.

A.3.4.g. CLORURO SODICO

Los estafilococos mantienen su viabilidad incluso en 23% de concentración de sal, si bien, en anaerobiosis, esta cifra queda disminuida al 14-16% (SCOTT, 1953; GENIGEORGIS et al., 1971). Al incrementar la concentración de ClNa, el crecimiento puede inhibirse en cierto grado (GENIGEORGIS et al., 1971; NDERU y GENIGEORGIS, 1975). Según diversos autores (GENIGEORGIS y SADLER, 1966; MARKUS y SILVERMAN, 1970; GENIGEORGIS et al., 1971; THOTA et al., 1973) la concentración máxima de ClNa a la que se produce síntesis de enterotoxinas es del 10%, quedando el efecto inhibitorio de la sal incrementado por la disminución de temperatura, el aumento de la concentración de nitritos y el pH cercano a los límites de síntesis de la enterotoxina. Sin embargo, MARKUS y SILVERMAN (1970) indicaron que concentraciones de ClNa hasta 10% no alteraban de forma marcada la relación entre la EEA producida y el crecimiento, aunque a mayores concentraciones se deprimía este segundo.

También parece haber una relación entre el método de cultivo y la sensibilidad al cloruro sódico, ya que se observó que la concentración máxima de ClNa que permitía el crecimiento de Staphylococcus cepa 100, productora de EEA, era de 12% cuando la incubación se realizaba en sacos de diálisis, mientras que cuando se hacía de forma convencional (en medio líquido libre), ésta era de 15%.

A.3.4.h. NITRATOS Y NITRITOS

El efecto antimicrobiano de los nitritos es debido al ácido nitroso sin disociar, incrementándose dicho efecto en valores bajos de pH (TROLLER, 1972). Por su parte, los nitratos, por la acción microbiana, pueden transformarse en nitritos (LECHOWICH et al., 1956).

Ciertos estudios realizados por McLEAN et al. (1968) ponen de manifiesto que el crecimiento y producción de EEB en BHI a pH 7.0 no queda afectado por una concentración de 1000 µg/ml de NO_3Na ó por 200 µg/ml de NO_2Na , pero que se apreciaba una disminución en la síntesis de la EEB cuando los iones nitrato o nitrito actúan conjuntamente con el ClNa. MARKUS y SILVERMAN (1970), por el contrario, apuntaron que la síntesis de EEA en medio líquido artificial no sólo no se veía afectada por estas concentraciones de NO_3Na y NO_2Na sino que el ClNa al 10% no actuaba según una cooperación sinérgica con estas sustancias, ya que no pudieron observar una depresión en la síntesis de esta enterotoxina.

La toxicidad que aparece en el jamón salado en anaerobiosis por causa de estafilococos enterotoxigénicos queda disminuida por el incremento en la concentración de ácido nitroso a pH superior o igual a 5.58 (GENIGEDORGIS et al., 1969). TOMPKIN et al. (1973) observaron que 300 g/ml de NO_2Na inhibía la producción de EEA a pH 5.3, pero no a 5.7. El efecto de NO_2Na sobre el crecimiento de los estafilococos varía con el pH, disminuyendo según éste decrece por debajo de pH 7.0; propusieron que McLEAN et al. (1968) y MARKUS y SILVERMAN

(1970) habían obtenido resultados negativos en cuanto a la capacidad limitante de los nitritos por estudiar los efectos en condiciones de pH cercanos a la neutralidad, lo que no era extrapolable a las carnes curadas, ya que en éstas el pH oscilaba entre 5.8 y 6.2. Los nitritos se vuelven muy bactericidas en el rango de pH de 4.5 a 5.5, ya que entonces adopta la forma de ácido nitroso, pudiendo interferir con el sistema metabólico de los estafilococos.

LECHOWICH et al. (1956) apreciaron un incremento de la tolerancia a los nitritos en anaerobiosis con sacarosa en mayor medida que con glucosa. Los componentes cárnicos destruyen los nitritos en ausencia de crecimiento bacteriano. La conclusión práctica es que ni el control del pH, ni la concentración de ClNa y/o la de NO_2Na deben ser utilizados en el alimento para impedir el desarrollo de estafilococos o la génesis de enterotoxinas por los mismos, si hay otras formas de conservación.

A.3.4.1. FLORA COMPETIDORA

Se ha manifestado con frecuencia que en poblaciones mixtas los estafilococos son unos competidores débiles frente a otros gérmenes (PETERSON et al., 1962b; TROLLER y FRAZIER, 1963a; TROLLER y FRAZIER, 1963b; PETERSON et al., 1970). El tema ha sido revisado por MINOR y MARTH (1971, 1972), RIEMANN y GENIGEORGIS (1972) y HURST (1973) y está ampliamente desarrollado en el apartado A del capítulo II.

El efecto inhibitorio de los microorganismos competidores ha sido explicado por la producción de sustancias antibióticas (TROLLER y FRAZIER, 1963b; MCCOY y FABER, 1966), de ácido láctico (HAINES y HARMON, 1973), de agua oxigenada (THOMPSON y JOHNSON, 1951; HAINES y HARMON, 1973), por disminución de los nutrientes esenciales, principalmente nicotinamida y biotina (IANDOLO et al., 1965; HAINES y HARMON, 1973) y por la producción de enzimas extracelulares antiestafilocócicas (COLLINS-THOMPSON et al., 1973).

Según MOSSEL y INGRAM (1955), la influencia de los microorganismos competidores sobre S. aureus es el resultado de varios factores, entre ellos:

1.- Niveles absolutos y relativos de contaminación inicial por estafilococos y otra microflora.

2.- Efectos selectivos del sustrato alimenticio sobre los diferentes microorganismos:

- factores químicos: tipo de nutrientes, pH, potencial Redox, compuestos antimicrobianos,

- factores físicos: aw, estructura del alimento,

- factores de procesamiento y manejo que influyen sobre el nivel inicial.

3.- Condiciones de almacenamiento: relación tiempo/temperatura, humedad relativa, atmósfera.

compuestos estimulantes o inhibitorios.

En general, las circunstancias que dificultan el crecimiento, inhiben en cierto modo la síntesis de enterotoxinas.

Muchos microorganismos del alimento originan una disminución del crecimiento de *S. aureus*, mientras que otros (*Secretia marcenses* y *E. coli*) no afectan el desarrollo pero, no obstante, no se detecta enterotoxina (McCOY y FABER, 1966). Por el contrario, otros gérmenes estimulan el crecimiento y la producción de enterotoxinas (McCOY y FABER, 1966).

Se han realizado numerosos estudios sobre los parámetros anteriormente citados de crecimiento y producción de enterotoxinas en derivados cárnicos y lácteos. Cualquier tipo de alteración en el procesamiento de los alimentos fermentados puede facilitar el desarrollo de las células de *S. aureus*, siendo las condiciones tales que si se llegase a producir enterotoxina en alguna etapa, sería poco probable su destrucción posterior. La síntesis de EEA en la leche depende de la calidad biológica de este producto, de la contaminación inicial de estafilococos y de la temperatura de almacenamiento (DONNELLY et al., 1967; TATINI et al., 1971).

La contaminación inicial tiene especial interés en la fabricación de quesos. Aquellos recuentos elevados en la leche cruda experimentarán un fuerte incremento durante el procesamiento si no se pasteuriza (RICHARDSON y DIVTIA, 1973).

Así mismo, el carácter ineffectivo del "starter" (por ejemplo, lisis celular por los fagos) puede ocasionar un incremento en el número de gérmenes enterotoxigénicos (REITER et al., 1964; JEZESKI et al., 1967; TATINI et al., 1971; TATINI, 1973).

Los cultivos "starter" utilizados en la elaboración de embutidos secos inhiben tanto el crecimiento, como la síntesis de enterotoxinas. BARBER y DEIBEL (1972) manifestaron que el germen Pediococcus cerevisiae impide el desarrollo total en anaerobiosis y parcialmente en aerobiosis. Así mismo, DALY (1973) ha observado que el Streptococcus diacetylactis inhibe en un 99% la multiplicación de S. aureus durante la elaboración de chorizo simulada en el laboratorio. El efecto del "starter" se mejoraba al añadir 0.75% de glucono- δ -lactona y 0.1 de ácido cítrico, siendo la inhibición del 99.99% tras 50 h a 21, 30 y 37 °C. El efecto antimicrobiano de la glucono- δ -lactona ha sido también puesto de manifiesto por BARBER y DEIBEL (1972) en el chorizo fermentado, tanto en atmósfera de aerobiosis como en anaerobiosis.

NOLETO y BERGDOLL (1980) han realizado un interesante estudio acerca del estímulo que representan cepas no enterotoxigénicas de S. aureus sobre otras que secretaban EEA y EED (196E) y EEC1 (137), a partir del cual sugirieron que se podía detectar enterotoxina en presencia de concentraciones elevadas de las primeras.

A.3.5. DIFERENCIAS ENTRE LA SINTESIS DE LAS ENTEROTOXINAS

De lo anteriormente expuesto se deduce que existe una gran variabilidad entre la producción de las distintas enterotoxinas. Probablemente donde más se manifiesten estas diferencias sea entre las enterotoxinas A y B, citándose numerosos brotes en los que se detectó la primera enterotoxina, y pocos en los que la inculpada fuera la EEB.

Ya en 1960 se divulgó el hecho del escaso número de intoxicaciones por EEB (SUGIYAMA et al., 1960), siendo corroborado posteriormente en varias ocasiones (MARKUS y SILVERMAN, 1970). DONNELLY et al. (1967) determinaron que la EEA era producida por 9 de 155 muestras de queso procedentes de mercados, y por 7 de 77 de quesos inculcados en intoxicaciones alimentarias, mientras que no hallaron ninguna muestra positiva a EEB. LEE et al. (1977) no detectaron EEB en salami pese al número elevado de células de estafilococos.

CASMAN (1965) explicó esta divergencia en base a que muchas menos cepas (aproximadamente la décima parte) sintetizan enterotoxina B en comparación con la EEA. A este respecto cabe mencionar igualmente los hallazgos de BENNET y AMOS (1982) quienes señalaron la elevada incidencia de intoxicaciones debidas a las EEA y EED al comparar con las ocasionadas por la EEB ó por la EEC, seguramente obedeciendo a una producción más precoz de las primeras. La síntesis de

EEB requiere un número de células más elevado y mayor tiempo cuando las cepas productoras son incubadas en atmósfera de N_2 .

No obstante, CASMAN y BENNETT (1963) habían señalado con anterioridad que en condiciones de laboratorio se sintetizaba más EEB que EEA ó EED.

Las condiciones de cultivo parecen afectar de forma más marcada a la síntesis de EEB que a la de EEA. Así, NOTERMANS y HEUVELMAN (1983) indicaron que la segunda enterotoxina se detectaba siempre que se producía crecimiento, mientras que la primera se deprimía notablemente por las condiciones de aw bajas. TROLLER (1971) había indicado no haber detectado EEB cuando la actividad de agua fue de 0.96, 0.93, 0.90 y 0.87, aunque el número de células de la cepa productora excedió de 10^7 /g. De igual forma, TROLLER (1976) facilitó el dato que el pH óptimo para la síntesis tanto de EEB como de EEC era 6.8, mientras que para EEA era de 5.3 a 6.8. FRIEDMAN (1968) señaló que la EEB era muy sensible a las condiciones de aditivos, condimentos y conservantes.

A.4. PATOGENIA

A.4.1. SINTOMAS

A.4.2. DOSIS TOXICA MINIMA

A.4.3. EXPERIMENTACION ANIMAL

A.4.4. MECANISMO DE ACCION

A.4.5. EFECTOS INDUCIDOS

A.4.5.a. GASTRICOS

A.4.5.b. PIROGENICOS

A.4.5.c. OTROS EFECTOS

A.4.6. CULTIVOS TISULARES

A.4.1. SINTOMAS

La intoxicación estafilocócica se manifiesta en el hombre por unos síntomas relativamente específicos que se desarrollan entre 1 y 6 horas después de la ingestión de la enterotoxina, siendo la media en los brotes masivos de 2 a 3 horas. El periodo prodrómico de los síntomas depende de la idiosincrasia del individuo así como de la cantidad de enterotoxina ingerida.

La intoxicación se caracteriza por náuseas, vómitos, diarrea y dolores abdominales, todo ello precedido de salivación profusa. Cuando el curso reviste mayor gravedad aparecen dolores de cabeza, calambres musculares y postración marcada, todo ello debido probablemente a la pérdida de fluidos. La fiebre es un fenómeno frecuente, aunque en ocasiones puede haber hipotermia. La presión arterial experimenta un descenso por el estancamiento de la sangre en el lecho vascular periférico (HODOVAL et al., 1968). BERGDOLL et al. (1973), señalaron la presencia de dolor renal por la eliminación de la toxina por esta vía.

-50-

Con carácter esporádico, la intoxicación estafilocócica reviste un carácter fatal, sobre todo en los grupos de riesgo como son los niños (la relación toxina ingerida/peso corporal es muy elevada) y los ancianos (por encontrarse aquejados de otras dolencias).

Los enfermos se recobran rápidamente, perdurando el cuadro sintomático desde unas pocas horas hasta tres días, y generalmente no requieren hospitalización. Cuando ésta es necesaria el único tratamiento que se sigue es la reposición de líquidos y de electrolitos perdidos.

La puerta de entrada de la enterotoxina suele ser oral. No obstante, SUAREZ (comunicación personal) experimentó un acceso de intoxicación por inhalación de enterotoxina E altamente purificada, mientras se hallaba realizando unas determinaciones con la misma.

A.4.2. DOSIS TOXICA MINIMA

Los datos a este respecto son numerosos, pero muy pocos autores están de acuerdo en una dosis tóxica mínima. Las razones son obvias, ya que para poder mencionar una cifra se harían necesarias experimentaciones con voluntarios.

En opinión de RAJ y BERGDOLL (1969) 50 µg de EEB (con el 50% de pureza) originó los síntomas típicos a las 2 a 4 horas

tras su ingestión. Algunos estudios posteriores (GILBERT et al., 1972) indicaron que la dosis mínima de EEA, EEB y EEC para el desarrollo de los síntomas era de 10-13 µg. Bajo la base de los niveles de enterotoxina observados en alimentos implicados en casos de intoxicación alimentaria y la cantidad de éstos ingerida, se ha sugerido que de 1 a 9 µg son suficientes para originar la intoxicación (CASMAN y BENNETT, 1963; GILBERT et al., 1972). BERGDOLL (1970) señaló que un sujeto voluntario enfermó tras la ingestión de queso con una cantidad de EEA inferior a 1 µg. Tanto los datos obtenidos a partir de epidemias naturales como por la experimentación con voluntarios inducen a pensar en la gran variabilidad en la sensibilidad entre los individuos, considerándose que 1 µg o menos es ya suficiente para producir intoxicación en las personas.

A.4.3. EXPERIMENTACION ANIMAL

Se han llevado a cabo muchos experimentos con animales de laboratorio, incluyendo entre éstos monos rhesus (SURGALLA et al., 1953; WILSON, 1959; SCHANTZ et al., 1965; CHU et al., 1966; BORJA y BERGDOLL, 1967; BERGDOLL, 1970; LIU et al., 1976), gatos, perros (GILBERT, 1966), conejos (PETTIT et al., 1977; LIU y SANDERS, 1980), chinchillas, visones (JUOKSLATHI et al., 1980), ratas (HODDOVAL et al., 1966), ratones y cabras (MIERT et al., 1984). MIERT et al. (1984) sostienen que la cabra es un buen modelo para estudiar los efectos de la EEB.

En general, los animales son mucho más refractarios que el hombre a la presentación de un cuadro clínico tras la administración oral de enterotoxina, pero pueden lograrse la mayoría de los efectos observados en el hombre por la administración parenteral.

La sintomatología en los monos antropoides, en especial en Macaculus rhesus, reviste un carácter semejante al del hombre (KENT, 1966). LIU et al. (1976) pudieron observar vómitos con hipertensión transitoria, palidez, distensión abdominal, diarrea ocasional y deshidratación por la administración intravenosa de 0.5 mg de EEA/kg en monos rhesus. Previamente a la muerte, la cual tenía lugar por término medio a las 8.7 h. después de la inyección, se establecía taquicardia e hipotensión.

También se puede provocar una respuesta característica en visones (JUOKSLATHI et al., 1980) por la administración oral de EEA (5-200 ug), acompañada de la pérdida del apetito, que se restableció tras 22 h, diarrea, neutrofilia, linfopenia, incremento del nitrógeno de urea en sangre y disminución del nivel de colesterol.

A.4.4. MECANISMO DE ACCION

El lugar de acción de las enterotoxinas es supuestamente el tracto digestivo; no obstante, aparecen otras manifestaciones

totalmente ajenas a éste, tales como hipertermia, alteraciones en la presión arterial, etc., de las que se deduce la instauración de toxemia, difundándose la toxina por el torrente circulatorio hacia otras localizaciones orgánicas. Los datos sobre este particular son deficientes ya que la concentración de toxina en sangre puede ser muy exigua y los métodos de detección no han gozado de la sensibilidad suficiente como para detectarla. Actualmente, las técnicas de RIA y ELISA podrían esclarecer estos supuestos. Se ha sugerido que la administración endovenosa de EEB puede ejercer su poder patógeno dañando el endotelio capilar del intestino grueso, permitiendo así la absorción de la toxina hacia la sangre. Este sería un fenómeno de tipo endotoxina, detectable por la capacidad del plasma de originar la gelación del lisado de amebocitos del cangrejo (GLAL). PETTIT et al. (1977) demostraron que la EEB tenía capacidad para inducir GLAL en el plasma, lo que implicaría tanto la liberación de toxina a través del intestino como la reducción del ritmo de eliminación. La única evidencia de que la toxina se difunde por el torrente circulatorio es el desarrollo de inmunidad en los monos cuando se utilizan para pruebas experimentales y se administra la toxina por vía digestiva (BERGDOLL, 1966). Se hicieron experimentos de protección pasiva transfiriendo el suero de un animal al que se había administrado repetidas dosis intragástricas de enterotoxina a otro mono no expuesto, observándose la ausencia de vómitos en este segundo.

A.4.5. EFECTOS INDUCIDOS

A.4.5.a. EFECTOS GASTRICOS.

Emesis. El mono rhesus ha venido utilizándose clásicamente como el mejor modelo experimental para las enterotoxinas estafilocócicas ya que su respuesta mimetiza la del hombre casi en su totalidad. Al parecer (SUGIYAMA y HAYAMA, 1965), la respuesta aferente alcanza el centro del vómito por el nervio vago y otros nervios simpáticos, pero estos experimentos no esclarecieron la localización de un órgano concreto como centro de la acción emética. Este impulso parece ser específico ya que los animales en los cuales se había practicado vagotomía no respondían con emesis cuando se les administraban dosis letales de enterotoxina pero si que lo hacían con otros vomitivos. Este trabajo fue discutido por THATCHER (1966) quien comentó que todas las respuestas eméticas están mediadas vía arcos reflejos que pasan a través del centro del vómito. Este autor concluyó que el lugar de acción de la enterotoxina se localiza en el cerebro anterior. SUGIYAMA et al. (1961) informaron que la enterotoxina B en los monos también actúa en el sistema nervioso periférico vía nervio vago. Se demostró que el lugar de actividad residía en un quimiorreceptor (CTZ) de la medulla oblongata; en gatos no se sigue esta ruta, ya que la eliminación del quimiorreceptor mencionado no afectó a la

respuesta emética.

Algunos fármacos como la dihidroergotamina pueden potenciar el vómito como han puesto de manifiesto SUGIYAMA et al. (1958, 1961, 1962, 1963) en varios trabajos.

Diarrea. Es otro signo característico de la intoxicación estafilocócica aunque no es privativo de ella. El hecho de que las enterotoxinas estafilocócicas no reaccionen en la prueba del asa intestinal ligada sugiere que los mecanismos implicados nada tienen que ver con el incremento de AMP ó de GMP cíclico como ocurre, por ejemplo, con las toxinas de E. coli. Parece ser que se pudiera tratar bien de la inhibición de la absorción de líquidos desde el lumen intestinal o del incremento del flujo de fluidos hacia el lumen, descartándose los fenómenos de incremento de la motilidad y de alteración del transporte iónico a través de la membrana del tubo digestivo. No obstante, KAPLAN y TENENBAUM (1982) indicaron que la ingestión de enterotoxina inducía un peristaltismo incrementado del intestino, probablemente debida a una disfunción del sistema nervioso autónomo. Tras una serie de experimentos que SULLIVAN y ASANO (1971) realizaron perfundiendo el intestino delgado de rata y determinando el transporte neto de agua e iones a través de la mucosa, se dedujo que las enterotoxinas ponen en marcha un mecanismo de secreción, no afectando al mecanismo de absorción. Hasta la fecha se desconoce si la administración intravenosa de EEB induce diarrea por mecanismos neurogénicos

y/o por un efecto directo sobre las células de la mucosa (MIERT et al., 1983).

Enteritis. Este fenómeno se observa en los casos de intoxicación grave y se manifiesta como hiperemia mucosa zonal, edema, irritación muscular, erosiones, petequias y exudado purulento (BERGDOLL, 1972). A nivel microscópico se observa inflamación intensa aunque reversible, con acortamiento de las vellosidades intestinales y elongación de las criptas, siendo máxima 4 a 8 horas después de la administración de EEB. Los cambios ultraestructurales incluyen alteraciones en las mitocondrias de las células intestinales y la presencia de gránulos de secreción (MIERT et al., 1983). En ocasiones se manifiesta por la aparición de pseudomembranas en las heces (MIERT et al., 1983), que también pueden ser sanguinolentas.

En este sentido hay que mencionar un proceso que tuvo gran transcendencia en la década de los 50: la enterocolitis pseudomembranosa. Esta enfermedad se desarrollaba en aquellos individuos que habían sido sometidos a un tratamiento antibiótico por vía oral por lo que su flora intestinal había experimentado una disminución notable, no siendo afectados los estafilococos. Los microorganismos de este género aislados de las heces se demostró secretaban toxina A y/o B en grandes cantidades (BERGDOLL, 1963).

A.4.5.b. EFECTOS PIROGENICOS

El carácter pirogénico de las enterotoxinas fue puesto de manifiesto por CLARK y PAGE (1968) cuando observaron en gatos un incremento de 2.7°C en la temperatura corporal, tras la inoculación de 0.1 a $1.0\text{ }\mu\text{g}$ de enterotoxina A ó B, así como tras la administración intragástrica ($25\text{--}50\text{ }\mu\text{g/kg}$). La administración intravenosa determinaba una curva bifásica (CLARK y BORINSON, 1963). Los efectos pirogénicos de la enterotoxina A son al parecer 3 a 6 veces más potentes que los de la B (BERGDOLL, 1970). MIERT et al. (1983) no encontraron una correspondencia inequívoca entre la respuesta febril y las modificaciones de los valores plasmáticos de zinc y hierro, lo que fundamenta la teoría que las reacciones febriles y los cambios en los elementos traza del plasma están mediados por la liberación de diferentes proteínas liberadas por los macrófagos activados.

A.4.5.c. OTROS EFECTOS

Otros efectos que se han observado han sido:

Descamación: el contacto con enterotoxina ha provocado la erupción vesiculosa y la descamación, afectando únicamente a la dermis.

Sistema nervioso central: los efectos observados sobre este sistema son los de desorientación y alteración de

la conciencia, principalmente. Tras la inyección intravenosa de 1 mg de EEB/kg en monos, HODOVAL et al. (1967) observaron que poco antes de morir los animales se producían cambios en el encefalograma manifestados por un descenso marcado de la frecuencia de onda y el incremento inicial de la amplitud con el desarrollo de shock preterminal. Se sugirió que la anoxia cerebral, originada por un aporte sanguíneo insuficiente es la causa primaria de las modificaciones del electroencefalograma, siendo en este sentido la EEB similar a las endotoxinas. Se desconoce si, en ausencia de hiperpirexia, se asociaría a la desorientación u otras alteraciones del sistema nervioso.

Renales: CRAWLEY et al. (1966) han informado que la eliminación de la enterotoxina inoculada en monos desaparece muy rápidamente de la sangre, haciéndolo el 60% en 60 segundos. La importancia de los riñones en la eliminación de la enterotoxina vino demostrada por el hecho de que la ligadura de ambas arterias renales retrasaba la desaparición de la EEB de la circulación (NORMANN et al., 1969). En este mismo experimento se pudo poner de manifiesto que los lugares de eliminación de las toxinas son los túbulos contorneados proximales, siendo alcanzados por la toxina mediante un proceso de filtración glomerular y de reabsorción tubular. Igualmente, MIERT et al. (1983) han sugerido una posible acción nefrotóxica de la enterotoxina B infiriéndolo del hecho de que las concentraciones de urea incrementaban en sangre a pesar de no observarse hemoconcentración.

Hepáticos: el hígado también parece revestir importancia en la eliminación de la toxina del torrente circulatorio (NORMANN et al. 1969). Los fenómenos hepáticos observados por LIU et al. (1977) tras la administración intravenosa de enterotoxina estaban evaluados por el retardo en la eliminación hepática de verde de indocianina.

Sistemas circulatorio e inmune: en Macacusc rhesus que habían recibido 0.05 a 1.0 mg EEB/kg se pudo detectar taquicardia, incremento de la resistencia arterial, disminución de la presión sanguínea, del ritmo cardiaco, del volumen de látido, del gasto cardiaco, de la potencia media cardiaca y del volumen sanguíneo central (LIU et al., 1977), alteraciones que parecen ser frecuentes en otras especies y en el hombre. Las alteraciones en las constantes sanguíneas más comúnmente observadas son hemoconcentración (debida por lo general a la pérdida de fluidos), con un incremento del hematocrito y de los valores de hemoglobina. MIERT et al., (1984) han señalado también la inhibición de las contracciones del rumen en cabras tras la administración de 0.02 a 0.5 µg de SEB/kg), aunque como ellos mismos señalaran, todas las sustancias pirogénas exógenas anulan esta función, probablemente por un mecanismo central que implica los centros gástricos. Otras alteraciones observadas han sido linfopenia y disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina sérica, cambios en el ritmo cardiaco, salivación, taquipnea. Con respecto a la linfopenia, GILBERT (1966) ha

señalado que de los datos habidos parece que ésta se establece por una eliminación o destrucción de los leucocitos más que por la alteración en la génesis de los mismos. Estas observaciones también fueron hechas por CRAWLEY et al. (1966) quienes indicaron que la EEB se unía a los leucocitos, siendo éstos secuestrados en los pulmones. Los animales resistentes (ratas) mostraron el periodo de distribución orgánica más lento, pero la eliminación renal era superior, por lo que la unión de la EEB a los receptores en los linfocitos podría suponer la base de la toxicidad.

La inoculación por vía intravenosa de EEB altamente purificada determinó ciertos cambios en las constantes de coagulación de perros "beagle" (GILBERT, 1966): tiempo de coagulación, retracción del coágulo, lisis del coágulo, recuento de leucocitos, tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial.

A.4.6. EFECTOS SOBRE CULTIVOS TISULARES

Los efectos de la EEB sobre algunos sistemas de cultivo tisular, tanto humanos (células embrionarias intestinales) se caracterizan por una agrupación y posterior desprendimiento de la fase sólida de las células en monocapa, que se neutraliza por el uso de antisueros específicos. La actividad citotóxica potencial de las enterotoxinas purificadas fue puesta de manifiesto por BUXSER y BONVENTRE (1981) quienes

estudiaron la integridad de la membrana celular, concluyendo que las enterotoxinas estafilocócicas (EEA y EEB) no se comportaban como otras citotoxinas.

A.5. ANALISIS DE ENTEROTOXINA EN MEDIOS ARTIFICIALES Y EN ALIMENTOS

A.5.1. METODOS BIOLOGICOS

A.5.2. METODOS INMUNOLOGICOS

A.5.2.1. REACCIONES DE INMUNODIFUSION EN GEL

A.5.2.2. HEMAGLUTINACION Y TECNICAS AFINES

A.5.2.3. TECNICAS CON REACTIVOS MARCADOS

A.5.2.3.a. FLUORESCENCIA

A.5.2.3.b. RADIOINMUNOANALISIS

A.5.2.3.c. ELISA

La detección de enterotoxinas estafilocócicas representa en ocasiones un problema grave. En algunos casos es difícil de determinar la importancia de la incidencia de las intoxicaciones estafilocócicas entre otras cosas por la falta de un sistema de detección efectivo y fiable. Según BERGDOLL et al. (1976) la sensibilidad de la técnica no debe ser inferior a la que se obtiene por el método usado por las Agencias Reguladoras. El método que utiliza actualmente el organismo estadounidense Food and Drug Administration detecta un mínimo de 0.1 a 0.2 µg de enterotoxina añadidos a 100 g de

alimento.

La pregunta más importante a responder es ¿cuál es la cantidad mínima de enterotoxina que se puede añadir a un alimento y ser detectada con el método empleado? Esta cantidad puede que no sea suficiente para provocar intoxicación en las personas que consuman el alimento, pero las variaciones individuales son tan marcadas en cuanto a la susceptibilidad a las enterotoxinas, así como a la cantidad de alimento ingerida que estas medidas son imprescindibles. En cualquier caso, si se detecta la presencia de enterotoxina en un alimento, éste no debería ser apto para el consumo.

La detección de las enterotoxinas en los alimentos se complica por el hecho de no existir un método biológico adecuado para hacerlo en muestras pequeñas, inferiores a 100 g. Los únicos métodos disponibles están basados en el uso de anticuerpos específicos, lo que plantea dos problemas adicionales:

- por un lado, se hace necesario comprobar la presencia de cada una de las enterotoxinas diferentes en el alimento, y además, como ya ha sido advertido en otro apartado,
- todavía existen enterotoxinas por identificar, aunque se pueda asegurar su presencia en alimentos, y determinar su intervención en brotes de intoxicaciones.

A.5.1. METODOS BIOLOGICOS

Los métodos biológicos que se han utilizado hasta la fecha incluyen la administración de la muestra sospechosa a voluntarios humanos, la inoculación intravenosa a gatos con filtrados de cultivos en los que los compuestos no enterotóxicos se habían vuelto inócuos y la administración de líquidos sobrenadantes de cultivos por vía oral a monos jóvenes. Todos estos métodos están actualmente desacreditados aunque en algunos laboratorios se haga uso de la prueba del gato ("kitten test") y para la detección de enterotoxinas aún no identificadas sea la prueba del mono la de elección.

El kitten test (DACK, 1949, citado por SURGALLA et al., 1953) presenta una serie de inconvenientes: por una parte exige muchos controles negativos y, por otra, es imprescindible la inactivación de sustancias que provoquen emesis de forma inespecífica. Debido a esto, algunos investigadores (SURGALLA et al., 1953; SUGIYAMA et al., 1962) propusieron la administración de extractos de cultivo a monos (*Macaca mulatta*) mediante una sonda intragástrica, considerando positiva la prueba cuando desencadenaba el vómito en el animal. Las pruebas biológicas siempre presentan los inconvenientes de la baja sensibilidad y la resistencia individual a ciertos aspectos de la intoxicación; además, debido a la creación de resistencias se hace necesario utilizar animales no tratados anteriormente, con los gastos e

inconvenientes que ésto representa. BERGDOLL (1966) apuntó que, a pesar de ello, los monos que se habían mostrado resistentes frente a una enterotoxina no tenían por qué serlo también frente a otras que fueran inmunológicamente diferentes; de hecho, ésto fue lo que sugirió en un principio la posible existencia de enterotoxinas de distintos tipos.

Otros métodos biológicos que se han descrito han sido la adición de enterotoxinas al medio nutricio de nematodos (CHANG y HALL, 1963), no observándose efectos entre 10 y 1000 µg/ml y la administración a ranas (ROBINTON, 1949).

A.5.2. METODOS INMUNOLOGICOS

Dados los problemas expuestos en el apartado anterior con respecto al diagnóstico biológico "in vivo", la metodología actual promulga el uso de técnicas serológicas para la detección de las enterotoxinas estafilocócicas. Estos métodos presentan el inconveniente de estar basados en la reacción específica antígeno-anticuerpo, por lo que aquellas enterotoxinas aún no identificadas y para las cuales no existen antisueros específicos no pueden ser detectadas. Además, se ha de considerar la dificultad que plantea la obtención de reactivos en pureza, así como la posibilidad de reacciones inespecíficas. No obstante, sus ventajas son muy marcadas, y se tiende a optimizar las técnicas de forma que

Tabla I4: Distintas técnicas de inmunodifusión en gel utilizadas por los diversos autores con indicación del límite de detección y de la duración de la prueba.

Técnica	límite de detección $\mu\text{g/ml}$	Duración	EET detectada	Año	Autores
Inmunodifusión sencilla en tubo	1.0	1-7 d	ABC AB B	1959 1963 1963 1965 1965 1966 1970	BERGDOLL et al. HALL et al. SILVERMAN HALL et al. SCHANTZ et al. WEIRETHER et al. WEISS y ROBBINS
Inmunodifusión sencilla en placa		1 d	AE	1980	MEYER y PALMIERI
Inmunodifusión doble en tubo	1-2 0.1 1.0	10-24 h 10-24 h 1 h	ABC ABCE ABD	1971 1973 1971	FUNG y WAGNER FUNG GANDHI y RICHARDS
Inmunodifusión doble en placa	0.1-10 0.5 0.1-0.01 0.3 0.6	7 d 18-30 d 3 d	AB ABCDE ABC D	1965 1974 1976 1969 1971 1980 1980 1964 1968	HALL et al. ROBBINS et al. BENNETT y McCLURE CASMAN et al. SIMKOVIKOVA y GIL PETRAS PETRAS CASMAN y BENNETT ZEHREN y ZEHREN
Electroforesis	1 0.1	2 d 10-18 h	B AB	1971 1973 1975	BAIER (PAGE) GASPER et al. SOMMERFELD y TERP
Inmunoelectroforesis inversa	1	5 h	A	1973	KIMBLE y ANDERSON
Otros	0.1-1 0.25	2-5 h 4-8 h	1973 B	1973 1979	GASPER et al. (LA MAJOR (LAURELL)

se anulen estos inconvenientes.

A.5.2.1. REACCIONES DE INMUNODIFUSION EN GEL (Tabla I4).

La única reacción específica que se ha utilizado para determinar la enterotoxina es la reacción con su anticuerpo específico. Esto presenta múltiples variantes, que serán el objeto de la exposición que continua.

Inmunodifusión sencilla en tubo: Basándose en el método descrito por Oudin, BERGDOLL et al. (1959) publicaron una técnica en la cual se registraba la velocidad de migración de la banda de precipitado formada por la reacción antígeno-anticuerpo. En esta técnica, y como fue puesto de manifiesto por HALL et al. (1965) repercuten de forma muy marcada la temperatura de incubación, el tamaño del tubo, el tiempo de incubación y la fuerza iónica del diluyente.

En 1971, GANDHI y RICHARDSON (1971) describieron una microtécnica de difusión sencilla, de acuerdo con la cual se podía detectar 1 µg de enterotoxina por el desarrollo de una línea de precipitado en el agar introducido en un capilar. Según estos autores aunaba las características de velocidad (la lectura se podía

sugerencia fue ligeramente modificada por FUNG y WAGNER (1971) utilizando pipetas capilares para su ejecución, aunque la sensibilidad por ellos obtenida fue de 1 a 2 $\mu\text{g/ml}$.

Inmunodifusión sencilla en placa: Esta técnica se debe a MEYER y PALMIERI (1980) quienes la utilizaron con éxito para detectar cepas enterotoxigénicas, aunque sostienen que también es adecuada para la detección de enterotoxinas presentes en los alimentos. Se basa en la adición de anticuerpos específicos al agar, dispensándolo en una placa. A continuación se practican pocillos en los que se depositan los extractos. Transcurrido cierto tiempo de incubación se pueden apreciar anillos de precipitación concéntricos con el pocillo, el diámetro de los cuales depende de la concentración de enterotoxina. Esta técnica sufre el inconveniente de la gran cantidad de anticuerpos que se requieren.

Inmunodifusión doble en tubo: Esta técnica fue desarrollada por vez primera por Oakley y adaptada a la detección de enterotoxinas estafilocócicas por HALL et al. (1965). En esta prueba el antígeno se difunde verticalmente hacia abajo hacia un estrato de agar tamponado, a la vez que los anticuerpos disueltos en agar difunden verticalmente hacia arriba, formándose una línea de

precipitado donde las concentraciones de uno y otro sean equivalentes.

Inmunodifusión doble en placa: La inmunodifusión doble permite por una parte la separación de sistemas múltiples en sus componentes individuales, y, por otra, la comparación de dos antígenos o anticuerpos para establecer su identidad total, parcial o nula (CASMAN, 1958). Esta presenta dos variantes, macrométodo y micrométodo. El primero fue desarrollado por ROBBINS et al. (1974), basándose en los principios establecidos por Wadsworth, y recibe el nombre de "optimum sensitivity plate" (doble difusión en gel con una sensibilidad óptima). Según esta técnica, se practican siete pocillos de dos diámetros diferentes en el agar dispuesto en una placa, llenándolos de los reactivos: muestra problema, enterotoxina y antisuero específico. Tras dejar incubar durante algún tiempo en atmósfera de humedad se observan las líneas de precipitado allí donde el antígeno y el anticuerpo se enfrenten (ver B.3.6.b.).

CASMAN y BENNETT (1965) propusieron un método miniaturizado con una sensibilidad potencial de 0.1 µg/ml, aunque sea difícil en la práctica alcanzar este límite. A fin de detectar 0.1 ó 0.2 µg en 100 ml de alimento hay que seguir un proceso largo y laborioso

consistente en la purificación y en la concentración de la muestra, que requiere varios días para reducir su volumen a 0.1-0.2 ml.

Muchos investigadores han intentado modificar este método a fin de acortar el tiempo necesario para obtener resultados y para hacerlo igualmente sensible a todos los tipos de alimento. REISER et al. (1974) variaron el método de forma que se pudiera realizar la lectura a partir del tercer día. Los cambios principales fueron:

1. Sustitución de la resina de intercambio iónico CG-50 utilizada por HALL et al. (1965) por carboximetil celulosa. La enterotoxina se adsorbía directamente a partir del extracto parcialmente tratado, eliminando la necesidad de concentrar durante 18 h con Carbowax.
2. Se añadía tripsina para digerir parcialmente las contaminaciones proteicas que pudieran interferir en el método del microporta.
3. Los microportas se incuban a 37°C, lo que permite la lectura al día siguiente.

Tabla 15: Técnicas de hemaglutinación y afines ensayadas con indicación del límite de detección y de la duración de la prueba.

Técnica	Límite de detección $\mu\text{g/ml}$	Duración	EET detectada	Año	Autores
Hemaglutinación pasiva directa	0.1 - 1	3 h	AB	1967 1967	MORSE y MAH JOHNSON et al.
Hemaglutinación pasiva inversa	0.0015 0.01	3 h 3 h	AB AE	1968 1977	SILVERMAN et al. YAMADA
Inhibición de la hemaglutinación	0.1	3 h		1967 1967	JOHNSON et al. MORSE y MAH
Agglutinación con látex	0.001	3 h	AB	1968 1969	SALOMON y TEW BARBUTI
Fluorescencia	0.1		B	1965 1972	FRIEDMAN y WHITE PLISZKA y WINDYGA

La hemaglutinación pasiva inversa (RPHA) fue desarrollada por SILVERMAN et al. (1968). Este método se basa en la adsorción de los anticuerpos específicos a eritrocitos de oveja tratados con ácido tánico, seguido de la aglutinación por las enterotoxinas de las células así sensibilizadas. Según los autores, el límite de detección del método es tal, (1.5 ng enterotoxina/ml) que se debería poder detectar el equivalente a 0.1 µg de enterotoxina por cada 100 g de alimento en un extracto de volumen por peso (es decir, 10 ml obtenidos por cada 10 g de peso iniciales) sin concentración. El tiempo requerido para obtener sensibilidad y lograr resultados es de 1 ó 2 días (REISER et al., 1974).

Más recientemente, YAMADA et al. (YAMADA et al., 1977) pusieron a punto una técnica mejorada de hemaglutinación pasiva inversa, utilizando eritrocitos de oveja formalinizados y sensibilizados con inmunoglobulinas anti-enterotoxinas A, B, C, D y E obtenidas en conejo. Según los mismos, la mejora de la técnica venía establecida por una mayor especificidad y reactividad, no observándose ninguna reacción "falso positivo" con ingredientes alimentarios, ni reacciones cruzadas entre los tipos de enterotoxinas. Indicaron que la cantidad mínima de enterotoxina detectable era de 0.01 µg/g sin concentrar, y que la recuperación de toxinas añadidas de forma experimental era del 80%. Las muestras podían ser procesadas en 3 h tras la recepción

de los especímenes.

Los inconvenientes de esta técnica fueron puestos de manifiesto por BERGDOLL et al. (1976) y se cifran en que los anticuerpos de algunos preparados séricos, en especial aquéllos que implicaban EEA, no se adsorbían o conjugaban adecuadamente a los eritrocitos; así mismo, se producía una aglutinación no específica de dichas células tratadas por los extractos alimentarios, principalmente los de origen cárnico.

Otra versión de esta misma técnica es aquélla que utiliza partículas de látex en lugar de eritrocitos (SALOMON y TEW, 1968; BARBUTI, 1969), pero en ocasiones los anticuerpos específicos frente a las distintas enterotoxinas están contaminados con otros que promueven la aglutinación espontánea de las partículas de látex (BLOBEL y SCHLIESSER, 1980).

La técnica de la inhibición de la hemaglutinación fue preconizada por JOHNSON et al. (1967) quienes conjugaron EEB a eritrocitos de oveja (SRBC) mediante bencidina bi-diazotizada, señalando que la sensibilidad del método era igual o superior al del microporta (0.1 µg/ml), aunque requiere cierta práctica para su interpretación. Casi al mismo tiempo, MORSE y MAH (1967), describieron la misma técnica, sólo que ellos utilizaron ácido tánico para conjuguar la EEB a los

eritrocitos.

A.5.2.3. TECNICAS CON REACTIVOS MARCADOS

Las técnicas que utilizan alguno de los reactivos marcados, bien el antígeno o bien el anticuerpo, están experimentando una gran promoción en los últimos años, principalmente en base a su especificidad y sensibilidad, gozando de un carácter de objetividad muy conveniente cuando se requiere procesar múltiples muestras.

A.5.2.3.a. INMUNOFLUORESCENCIA

Haciendo uso de inmunofluorescencia directa FRIEDMAN y WHITE (1965) detectaron la presencia de enterotoxina B en la superficie de los estafilococos de la cepa S6, demostrando así que esta técnica era válida al menos para determinar qué cepas eran enterotoxigénicas. Posteriormente, PLISZKA y WINDYGA (1972) probaron que también era adecuada para detectar esta misma enterotoxina en leche humana y de vaca, así como en queso. Según dichos autores, la sensibilidad era superior a la obtenida con la técnica de microprecipitación en gel.

A.5.2.3.b. RADIO IMMUNO ANALISIS (Tabla I6)

En la bibliografía, varios laboratorios han preconizado el

Tabla 16: Límite de detección obtenido por los diversos autores mediante la técnica del radioinmunoanálisis.

límite de detección	EET detectada	Año	Autores
1-5 ng/ml	B	1971	JOHNSON et al.
10 ng/ml	B	1972	COLLINS et al.
10 ng/ml	A	1973	COLLINS et al.
1.25 ng/ml	A	1973	PARK et al.
100 pg	C ₂	1975	ROBERN et al.
1-10 ng	C	1975	BUKOVIC y JOHNSON
100 pg	AB	1978	ROBERN y GLEESON
1 ng/ml	AC	1977	ORTH
200 pg 2-5 ng/ml	A	1977	LINDROTH y NISKANEN
1.2-6.3 ng/g	B	1978	NIYOMVIT et al.
< 1 ng/g	AD	1978	MILLER et al.
0.1 ng/g	A	1980	ARESON et al.
0.3 ng/ml	A	1982	DICKIE y AKHTAR

uso del RIA como método de elección para la detección y análisis de enterotoxina en sobrenadantes de cultivos y en los extractos alimentarios (JOHNSON et al., 1971; COLLINS et al., 1972; COLLINS et al., 1973; DICKIE et al., 1973; JOHNSON et al., 1973). Brevemente, en el RIA un antígeno en una muestra problema está compitiendo por los anticuerpos específicos con una cantidad determinada del mismo antígeno marcado con algún isótopo radiactivo (BERGDOLL y REISER, 1980); de este modo y por diferencia puede establecerse no sólo la existencia de una reacción de identidad, sino también se puede determinar la cantidad del antígeno problema presente en la muestra.

El procedimiento general consiste en adsorber los anticuerpos específicos a la superficie interna de tubos de plástico (JOHNSON et al., 1971; DICKIE et al., 1973; JOHNSON et al., 1973; BUKOVIC y JOHNSON, 1975; BUKOVIC et al., 1975; ORTH, 1977; DICKIE y AKHTAR, 1982) o conjugarlo a bromoacetil celulosa (COLLINS et al., 1972; COLLINS et al., 1973). Otra variante preconiza el uso de células de *S. aureus* conteniendo proteína A (MILLER et al., 1978; ARESO et al., 1980). La enterotoxina problema puede añadirse a los tubos que contienen los anticuerpos antes de la adición de la enterotoxina marcada (JOHNSON et al., 1971; DICKIE y AKHTAR, 1982) o mezclarse con esta última y añadirse a la vez (DICKIE et al., 1973). Tras un periodo de incubación más o menos largo, se procede a retirar la enterotoxina y se determina la

muestra problema se calcula a partir de la inhibición de la reacción con la enterotoxina marcada.

ROBERN et al. (1975) publicaron otra modificación de la técnica, denominándola del "doble anticuerpo", (LINDROTH y NISKANEN, 1977; ROBERN et al., 1978) por la cual se adicionan los anticuerpos específicos de la enterotoxina a detectar a una mezcla de muestra problema y enterotoxina marcada, para añadir a continuación inmunoglobulinas anti-especie adsorbidas a una fase sólida, o precipitadas por polietilen glicol (ROBERN y GLEESON, 1978).

NIYOMVIT et al. (1978) propusieron un método de radioinmunoensayo de afinidad, por el cual copulaban de forma covalente los anticuerpos específicos a Sepharosa 4B, mediante bromocianuro, introduciéndolos en una columna a través de la cual se hacía pasar la solución con enterotoxinas problema y la marcada mezcladas. Tras determinar la radiactividad del eluyente se podía calcular la cantidad de enterotoxina problema captada por los anticuerpos. La sensibilidad de la técnica era similar a la de los demás radioinmunoensayos, pudiéndose detectar enterotoxinas también a partir de extractos alimentarios. La ventaja de este método radicaba en una mayor velocidad de análisis, pudiéndose completar en dos o tres horas.

El isótopo de elección ha sido el I^{125} en un alto porcentaje de ocasiones, conjugándose con las enterotoxinas generalmente

mediante cloramina T (KAUFFMAN y JOHNSON, 1975; NISKANEN y LINDROTH, 1976), lactoperoxidasa (ROBERN et al., 1975; ORTH, 1977) o yodo gaseoso (COLLINS et al., 1973).

Las variaciones en cuanto al límite de detección del RIA son múltiples: JOHNSON et al. (1973) indicaron haber obtenido una sensibilidad de 1 a 10 ng de toxina por gramo de alimento, siendo las inhibiciones inespecíficas inferiores al 15%. BENNETT et al. (1973) al comparar el método del microporta con el RIA pudieron detectar 5 a 10 ng, si bien utilizaron dos volúmenes de extracto por uno de peso del alimento. PARK et al. (1973) detectaron 1.5 ng/g aunque estos investigadores han sugerido que es necesario cierto grado de tratamiento de algunos extractos alimentarios para evitar interferencias.

En resumen, el RIA es un método muy prometedor para la detección de enterotoxinas, si bien las limitaciones principales son, entre otras, necesidad de hacer uso de enterotoxinas purificadas (al menos con un 90% de pureza) y que existen ciertas dificultades para el manejo de isótopos radiactivos. Otras desventajas con las que se debe contar, es que la vida media del antígeno marcado con yodo es muy corta, pudiendo sobrevenir la agregación de la proteína marcada y la pérdida de la inmunorreactividad.

Por otra parte, goza de las ventajas de realizarse la extracción de las enterotoxinas a partir de los alimentos por un procedimiento sencillo y requerirse una cantidad pequeña

de alimento. Igualmente, las reacciones cruzadas con enterotoxinas heterológicas no interfieren con la especificidad (JOHNSON et al., 1971), y el test combina las características de sensibilidad y de objetividad.

A.5.2.3.c. METODO ELISA (Tabla 17)

Las técnicas inmunoenzimáticas se han utilizado en los últimos años con gran frecuencia para la detección de proteínas. Los principios son los mismos que los del RIA sustituyendo el isótopo radiactivo por un enzima.

Los primeros en emplear la técnica ELISA para la detección de enterotoxinas estafilocócicas fueron SAUNDERS y CLINARD (1976) y SAUNDERS y BARTLETT (1977). En 1977 SIMON y TERPLAN (1977) describieron un sistema competitivo para la EEB cuya sensibilidad oscilaba entre 1 y 0.1 ng/ml, seguidos en ese mismo año por FEY y STIFFLER (1977). STIFFLER-ROSENBERG y FEY (1978) propusieron la variante de "prueba de las tres bolas" utilizando bolas de poliestireno que eran recubiertas por el reactivo, concretamente anticuerpos específicos, con una sensibilidad de 0.1 ng de enterotoxina A, B o C por ml. A partir de entonces se sucedieron los informes de investigadores acerca de la aplicación del enzimo inmuno ensayo a la detección de las enterotoxinas (MORITA y WOODBURN, 1978; NOTERMANS et al., 1978; FEY et al., 1980; KAUFFMAN, 1980; KOPER et al., 1980; KUD y SILVERMAN, 1980;

Tabla 17: Tipos de enzimoimmunoensayo utilizados por los diversos autores con indicación del límite de detección señalado y del enzima utilizado.

Tipo EIA	Enzima	Fase sólida	Límite de detección ng/ml	Año	Autores
doble Ac	HRPO		0.4 - 3.2	1977	SAUNDERS y BARTLETT
competición	HRPO	b	0.1	1977	SIMON y TERPLAN
competición	FA	b	0.1	1978	STIFFLER-ROSENBERG y FEY
competición	HRPO				
competición	β -am	t	1	1978	MORITA y WOODBURN
sandwich	HRPO	t		1979	NOTERMANS y KOPER
competición	FA	t	0.25	1980	KUO y SILVERMAN
competición	HRPO				
competición	FA	SpA	2	1980	KAUFFMAN
sandwich	HRPO	t	50	1980	KOPER et al.
doble Ac	FA	p	0.5	1981	BERDAL et al.
sandwich	HRPO	p	1	1981	BUNING-PFAUE et al.
	HRPO			1981	OUDEAAR y HAAS
sandwich	HRPO	p	1	1982	FREED et al.
sandwich competición	HRPO	p	1	1982	NOTERMANS et al.
doble Ac	FA	p	1	1982	OLSVIK et al.
competición	FA	t	2.5	1983	LENZ et al.
sandwich	HRPO	p	0.5	1983	NOTERMANS et al.
competición	FA	b	0.1	1984	FEY et al.

HRPO: peroxidasa de rábano picante; FA: fosfatasa alcalina; β -am: β -amilasa;

b: bolas; t: tubo; p: placa; SpA: proteína A estafilocócica;

BERDAL et al., 1981; FEY, 1982; FEY et al., 1982; FREED et al., 1982; NOTERMANS et al., 1982; LENZ et al., 1983).

Las diferentes modalidades de ELISA que se realizan son el ELISA competitivo (KAUFFMAN, 1978), el "sandwich" ELISA y el ELISA doble "sandwich". Todos estos sistemas exigen al menos un componente muy purificado y, dado que es más fácil obtener anticuerpos que antígeno puro, suelen ser los primeros los de elección.

En el ELISA competitivo (KAUFFMAN, 1978; STIFFLER-ROSENBERG y FEY, 1978) la enterotoxina marcada con el enzima compete con la toxina problema por una cantidad limitada de anticuerpos específicos. Los anticuerpos ligados a la enterotoxina se separan de los no ligados mediante proteína A, añadiéndose a continuación el sustrato y procediendo a determinar la densidad óptica de la reacción coloreada. La sensibilidad de esta técnica es de 2 ng de enterotoxina por ml o por gramo de alimento.

Las variantes que utilizan una fase sólida pueden realizarse tapizando bien los pocillos con fondo plano de placas de microtitulación, bien las paredes internas de tubos de poliestireno, o bien bolas de poliestireno (FREED et al., 1982; FEY et al., 1984;). La ventaja del primero es la capacidad de automatización en el supuesto de tener que realizar muchas pruebas a la vez, siempre que sea asequible disponer de un lector de placas. Los enzimas más utilizados

han sido la peroxidasa (obtenida de rábano picante) (FREED et al., 1982; NOTERMANS et al., 1983) y la fosfatasa alcalina (obtenida de mucosa intestinal de ternera) (KAUFFMAN, 1980; OLSVIK et al., 1982).

OLSVIK et al. (1982) y anteriormente SAUNDERS y BARTLETT (1977) preconizaron una técnica con anticuerpos obtenidos en dos especies, utilizando anticuerpos anti-inmunoglobulinas de la primera especie. Posee la ventaja de hacerse innecesario el uso de anticuerpos marcados específicos frente a cada enterotoxina, siendo su sensibilidad de 1 ng enterotoxina/ml.

La sensibilidad de la técnica es similar a la obtenida con el radio inmuno análisis, y conjuga las ventajas de ser rápida y reproducible, siendo el equipo necesario para llevarla a término el que se utiliza de forma rutinaria en los laboratorios.

Cuando se hace uso de las técnicas inmunológicas siempre hay que tener presente que la existencia de proteína A estafilocócica (SpA) puede enmascarar la reacción, ofreciendo un resultado falso positivo, por su capacidad de unirse de forma inespecífica a la porción Fc de ciertas inmunoglobulinas. Esto ya fue puesto de manifiesto por NOTERMANS y KOPER (1979), aunque otros (FREED et al., 1982; OLSVIK et al., 1982) opinan que no se ha demostrado que la SpA se encuentre presente en los alimentos en cantidad suficiente como para provocar interferencias. Se han

propuesto varios métodos para soslayar la interferencia. KOPER et al. (1980) habían sugerido el uso de los fragmentos $F(ab')_2$ de las inmunoglobulinas, que no ligan proteína A, pero en opinión de FREED et al. (1982) es laborioso y suele menoscabar la sensibilidad, por lo que estos investigadores y NOTERMANS et al. (1982) propusieron obtener los anticuerpos específicos en oveja, ya que la IgG de esta especie muestra baja afinidad por la SpA. FEY et al. (1984) sugirieron la absorción de la posible proteína A presente en el medio mediante la adición de suero normal de conejo a los extractos.

El mayor problema que se presenta en la detección de las enterotoxinas es la existencia de enterotoxinas aún no identificadas. Esto se resolvería analizando exhaustivamente las enterotoxinas, con la esperanza de encontrar un test específico para todas las enterotoxinas, identificadas y no identificadas.

A.6. ESTABILIDAD DE LAS ENTEROTOXINAS

A.6.1. EFECTO DEL CALOR

A.6.2. EFECTO DEL pH

A.6.3. EFECTO DE LAS PROTEASAS

A.6.4. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO

Las enterotoxinas estafilocócicas son, en muchos aspectos, más estables que otras proteínas.

A.6.1. EFECTO DEL CALOR

En la práctica, la propiedad química más importante de las enterotoxinas es su termorresistencia. Son considerablemente más resistentes que los propios S. aureus así como más que las toxinas de otros microorganismos. La destrucción de las enterotoxinas por el tratamiento térmico ha sido estudiado de forma intensiva:

EEA: CHU et al., 1966; DENNY et al., 1966; HILKER et al., 1968; DENNY et al., 1971; SOO et al., 1973 HUMBER et al., 1975.

EEB: READ y BRADSHAW, 1966a, 1966b; JAMLANG et al., 1971; FUNG et al., 1973.

EEC: FUNG et al., 1973.

EED: SOO et al., 1973; SOO et al., 1974.

Tras someter enterotoxina no purificada a ebullición durante 30 minutos permanecen todavía restos de toxicidad, como se puede apreciar por las distintas pruebas biológicas (BERGDOLL, 1983). Los factores que afectan a la termorresistencia son la temperatura, el tiempo de exposición, el tipo y concentración de la enterotoxina y el sustrato sobre el que se identifica. La EEB es más resistente que la EEA, presentando la EEC una sensibilidad media. Así mismo, la resistencia que ofrece la enterotoxina purificada

es superior a la que no ha sufrido ningún proceso de este tipo.

Las enterotoxinas inactivadas térmicamente, bajo ciertas condiciones pueden volver a presentar sus características, es decir, ser reactivadas (CHORDASH y POTTER, 1976). Depende principalmente de la temperatura y del tiempo de exposición, siendo la reactivación más completa tras la desactivación a 80°C que a 100°C, y más rápida a 25°C que a 4°C.

DENNY et al. (1966) realizaron una serie de experimentos en los que calentaban enterotoxina A no purificada a diferentes temperaturas y por periodos de tiempo diversos, determinando que tras calentar a 121°C durante 11 minutos, la inyección intraperitoneal en gatos era totalmente inefectiva en cuanto a la presentación de la sintomatología característica. Posteriormente este grupo de investigación (DENNY et al., 1971) informaron que por difusión sencilla en tubo se detectaba enterotoxina presente (niveles iniciales 20 µg/ml) en caldo de carne calentado a 121°C durante 37 minutos.

La EEB sufre una desactivación mas rápida a 80°C que a 100°C (SATTERLEE y KRAFT, 1969; JAMLANG et al., 1971). Según SATTERLEE y KRAFT (1969), la rápida pérdida de actividad a 70-80°C se ha explicado por la agregación térmica. El agregado se redisuelve a 100°C, recuperando el 35-40% de la actividad inmunológica.

Se han realizado numerosos estudios de la destrucción térmica de las enterotoxinas en soluciones buffer como sustrato. Investigaciones comparativas en alimentos han demostrado que la inactivación es más extensa que en los buffer. A este respecto, sugieren SATTERLEE y KRAFT (1969) que las enterotoxinas forman con las proteínas cárnicas uniones no detectables, siendo inactivada la enterotoxina libre. DENNY et al. (1971) han demostrado que la EEA sufre una desactivación superior en buffer fosfato que en caldo de carne, así como que las concentraciones iniciales elevadas en cualquiera de ambos incrementan la termotolerancia. En otro estudio (LEE, 1975), se comprobó que la termoestabilidad de la EEA y de la EEB era superior en carne que en BHI.

El pH ácido facilita la termodestrucción (HUMBER et al., 1975). BORJA et al. (1972) opinan que la toxicidad y la reacción antígeno-anticuerpo de la EEE desaparece tras el calentamiento a pH 2 ó pH 12.

La pasteurización de la leche (72°C durante 15 segundos) destruye tan solo el 30% de la EEA o de la EEB, mientras que el tratamiento UHT (143°C, 9 segundos) disminuye al 4-8% una concentración de 0.5-0.05 µg/ml de EEA y al 10% 0.05 µg/ml de EEB (SOD et al., 1973). La leche tratada de esta forma es susceptible de una nueva contaminación, pero la tensión de oxígeno ha disminuido y no es propicia para el desarrollo (LANGEVELD y BOLLE, 1979). READ y BRADSHAW (1966) observaron que 30 µg/ml de EEB en leche cruda, tras ser tratada a 98.9 -

210°F durante 134.2 minutos descendía a menos de 0.5 µg/ml. El secado por atomización (leche en polvo) no inactiva la EEB añadida, ni la EEA producida en la leche. CHOPIN et al. (1978) opinan que las probabilidades de encontrar enterotoxinas en leche en polvo después de ocho meses es alta, mientras que con anterioridad a los tres meses es baja.

HUMBER et al. (1975) siguieron la inactivación térmica de la EEA por inmunodifusión y por el "monkey-feeding test", indicando sus resultados que la toxicidad de la misma en monos rhesus desaparece más rápidamente que la actividad serológica. Estos autores introdujeron, por lo tanto, la posibilidad interesante y notoria de que haya resultados serológicos positivos sin que se correlacionen con una toxicidad manifiesta para el hombre. No obstante, los seres humanos son más sensibles a las toxinas que los monos.

A.6.2. EFECTO DEL pH

La EEB permanece estable durante una semana a temperatura ambiente en buffer fosfato 0.05M y a pH entre 4.0 y 7.3 (ANGELOTTI, 1969). Su actividad serológica se mantiene en el mismo buffer entre 2 y 5°C y pH 7 durante 6 meses (BORJA et al., 1972). A pH 3 y 10 las enterotoxinas permanecen activas entre 22 y 24°C durante al menos 4 h. GENIGENORGIS (1974) no ha observado reacción positiva con el antisuero en condiciones extremas de pH (1.85 y 12). La EEE quedaba destruida a pH 2 ó 12 durante 24 h pero no a pH 4.5 (BORJA et

al., 1972).

A.6.3. EFECTO DE LAS PROTEASAS

BERGDOLL et al. (1973) estiman que las enterotoxinas son resistentes a enzimas tales como la tripsina, quimotripsina, renina o papaina. La pepsina produce desactivación de la EEB a pH 2, pero es inefectiva a valores superiores de pH. Mientras que la EEC3 responde de forma similar que la EEB a la desactivación, por el contrario, la EEF se destruye por la pepsina en pH de 4.5, pero es resistente a la digestión por tripsina. La resistencia a las enzimas proteolíticas permite que las enterotoxinas superen el estómago sin afectarse su actividad biológica.

NISKANEN y LINDROTH (1976) demostraron que una mezcla de peptidasa de pseudomonas y tripsina no determinaba la hidrólisis de EEA. Igualmente, CHORDASH y POTTER (1976) encontraron que un incremento considerable de bacterias proteolíticas no reducen 20 µg de enterotoxina/ml después de 2 a 5 días en tres sustratos diferentes. Por el contrario, tras dos días, se observó la disminución de enterotoxinas estafilocócicas al incubar de forma conjunta estafilococos con Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus helveticus, Pediococcus pentosaceus, Streptococcus thermophilus y Streptococcus faecalis var. liquefaciens en caldo APT (All Purpose Medium) con Tween.

A.6.4. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO

La solubilidad y toxicidad de la toxina liofilizada almacenada a 4° C no ha experimentado cambios después de un año (GENIGEORGIS, 1974). Se ha apreciado que las enterotoxinas mantenían su actividad en el queso Cheddar durante más de tres años (CORDS y TATINI, 1973) y en embutido congelado por más de un año (NISKANEN y NURMI, 1976). LEE et al. (1975) detectaron EEA y EEC en pastas alimenticias secas pasado un año a 25°C.

También se ha notificado (DONNELLY et al., 1970) que la EEA desaparecía de algunas muestras de leche después de una incubación prolongada a 35° C. La misma observación fue realizada con la EEC expuesta durante 7 días a 17°C, pero no con la EEA (NISKANEN y NURMI, 1976), que permanecía activa tras 30 días a la misma temperatura.

A.7. EPIDEMIOLOGIA

A.7.1. FUENTES DE LOS ESTAFILOCOCOS

A.7.2. ALIMENTOS IMPLICADOS

A.7.3. BROTES HABIDOS EN ESPANA EN LOS ULTIMOS ANOS

A.7.1. FUENTES DE LOS ESTAFILOCOCOS

Los estafilococos tienen naturaleza ubicua, localizándose en

las fosas nasales, garganta y piel. Se asocian con forúnculos, heridas, incisiones, osteomielitis y neumonía entre otros. El reservorio más importante de estafilococos es la membrana mucosa de la nasofaringe y la piel de los animales y del hombre. Se ha estimado que el 30-50% de los individuos sanos alojan S. aureus en la membrana mucosa nasal, y del 4-60% de los mismos en la garganta (WILLIAMS, 1963). Otros datos indican que el 32% de los empleados en mataderos y en factorías cárnicas, avícolas y piscícolas contienen estafilococos coagulasa positivo en la cavidad nasal. Más alarmantes son los datos aportados por BRYAN (1970) quien supone que el 80% de los individuos que manejan alimentos en industrias tienen S. aureus en la piel, a pesar de que este pueda no ser patógeno. No obstante, pueden ser origen de abscesos, sinusitis, tonsilitis, queratitis ulcerativa, etc., recomendándose que las personas con estos procesos no deben tener acceso al manejo de los alimentos (MORENO y FRANCISCO, 1984; MORA et al., 1984; BLANCO et al., 1984). Según NISKANEN y KIRANEN (1977), por técnicas de tipificación por bacteriófagos indicaron que las cepas que causan brotes epidemiológicos son de origen generalmente humano, siendo generalmente la fuente los estafilococos alojados en las fosas nasales de los individuos sanos.

A pesar de encontrarse los estafilococos comúnmente en las fosas nasales y en la piel de los animales domésticos (BERGDOLL, 1982), muchas de las enfermedades de dichos animales de origen estafilocócico presentan un peligro de

contaminación de los alimentos, como materia prima. En los animales domésticos se ha demostrado la implicación estafilocócica en las siguientes enfermedades: mastitis del ganado vacuno, dermatitis pustulosa de los perros y úlceras sépticas en todas las especies. Según NURMI y KOIRANEN (1967), el 28.1% de las mastitis agudas y el 35.8% de las crónicas están causadas por S. aureus. Diversos autores (NYHAN y ARCHER, 1967) han observado recuentos elevados de estafilococos tanto en leche natural normal como en leche mamética.

ELEK (1959) ha sugerido también el origen telúrico de la intoxicación, presentándose el germen que nos ocupa en el polvo y en gotículas ambientales.

A.7.2. ALIMENTOS IMPLICADOS

Los alimentos implicados dependen en gran parte del régimen alimentario del país. En el nuestro, los que probablemente adquieran una mayor importancia en este sentido por la asiduidad de su consumo sean los derivados lácteos, la carne y sus subproductos y los productos de bollería.

La intoxicación alimentaria por productos lácteos, a pesar de haber tenido incidencia, es lo cierto que las modernas prácticas de higiene de la leche descartan por lo general la probabilidad de que se produzca. Pero en nuestro país sigue

produciéndose, lo que cuestiona los aspectos higiénico-sanitarios del problema. La fuente más frecuente de S. aureus como fue expuesto anteriormente, es la maitis bovina; pero una vez pasteurizada la leche es susceptible de recontaminarse con estafilococos de cualquier otro origen y, debido a la falta de competencia, proliferar hasta niveles peligrosos. Los derivados lácteos también pueden vehicular enterotoxina si la leche fue expuesta a tratamientos de subpasteurización, sobreviviendo algunos gérmenes o si contenía enterotoxina antes de elaborarse el producto. Se ha observado la presencia de enterotoxina en leche descremada en polvo (CHOPIN et al., 1978), leche descremada condensada (GEORGE et al., 1959), mantequilla y crema (MINOR y MARTIN, 1972a), queso en los casos que el cultivo "starter" sea de calidad inferior (como se expondrá en el capítulo II). Así mismo, otros derivados fermentados, tales como el yogur o la crema ácida, no son favorables para la producción de enterotoxina.

La carne también puede vehicular estafilococos enterotoxigénicos si su procedencia era de alguna localización orgánica cercana a abscesos (CRAVEN et al., 1978). Con mayor frecuencia se ven implicados en brotes de toxo-infecciones alimentarias los derivados cárnicos que implican una maduración o fermentación, como son las salchichas (EMSWILLER-ROSE et al., 1980), salami (METAXOPOULOS et al., 1981) y el bacon (LEE et al., 1981), por citar algunos.

Tabla 18: Brotes de intoxicación estafilocócica acaecidos en España en los últimos cuatro años.

Año	Lugar	Fecha	Personas afectadas (%)	Personas Hospitalizadas	Periodo de incubación (h)	Origen	Alimento	Fuente
1980	Madrid							
	León		100				Tarta	
	Madrid		103				Ensaladilla Pasteles	
	Avila		26				queso fresco	
	Badajoz		26				queso fresco	
1981	Santander	Agos.	43	38	1½-4½ 5	Banquete		
	Zamora	Agos.	13 (65.5)				Ensaladilla	
	Tenerife		14			Familiar	queso fresco	
1982	Málaga	Febr.	40 (3.33)		1-6	Colegio	bollos	Manipulador portador nas;
	Asturias	Marz.	23 (17)			Colegio		

Tabla 18: Continuación.

Año	Lugar	Fecha	Personas afectadas (%)	Personas hosp.	Periodo de incubación (h)	Origen	Alimento	Fuente
1982	Asturias	Marzo	125 (50)		6-10	Colegio		
	Valencia	Mayo	57 (55)		1-12	Banquete	Tarta	
	Valencia	Mayo	42 (40.8)		1-6	Banquete	Tarta	
	Santander	Abril	114			Colegio	Ensaladilla rusa	Manipuladores por- tadores de estaf.
	Valencia	Junio	180	37	3	Banquete	Pulpo a la vinagreta	
	Tenerife	Junio	90 (67.7)		8-12	Comedor industrial		
	Cordoba	Agosto	40			Banquete	Lubina	
	Granada	Agosto	150 (68)	19	2	Banquete	Pastel de boda	
	Valencia	Agosto	23 (50)	2	6		Tarta	Manipulador
	Murcia	Sept.	60 (30)					
	Tenerife	Nov.	6		3-6	Banquete	queso blando	Manipulador

Tabla 18: Continuación.

Año	Lugar	Fecha	Personas afectadas (%)	Personas hosp.	Periodo de incubación (h)	Origen	Alimento	Fuente
1983	Tenerife	Marzo	6			Familiar	queso fresco	
	Huelva	Marzo	7			Familiar	queso fresco	
	Tenerife	Marzo	3		3	Familiar	queso fresco	
	Vizcaya	Marzo	4		2	Familiar	Leche	
	Vizcaya	Junio	11 (31)	5		Banquete	Tarta	Manipulador
	Vizcaya	Junio	22 (38)			Banquete	Tarta	
	Tenerife	Marzo	6 (100) 177 (54.3)	1	2-4}	Familiar	Tarta	Manipuladores
	Barcelona		2	71	3-8		Macarrones	Manipuladores
	Tenerife	Mayo	2		4		queso fresco	
	Badajoz	Mayo	140 (70)		7	Colegio		
	Cordoba	Junio	100 (33.3)					
	Cádiz	Julio	24		4-6	Familiar	Tarta + Brazo Gitano	
	Granada	Sept.	25 (100)			Familiar	Tarta	Manipulador

Tabla 18: Continuación.

Año	Lugar	Fecha	Personas afectadas (%)	Personas hosp.	Periodo de incubación (h)	Origen	Alimento	Fuente
1983	Madrid	Sept.	100			Colegio		Manipulador
	Madrid	Oct.	80		12-14	Colegio		Manipulador
1984	Castellón		22 (44)			Hotel	Mayonesa	Exudado nasal Manipuladores Manipuladores
	Granada		9 (75)		1½	Familiar	Pastel de crema	
	Granada	Agosto	200		6-7	Banquete		
	Vizcaya	Sept.	6 (54.5)		3	Familiar	Ensaladilla	
	Tenerife	Oct.	3		4	Familiar	Queso blanco	
	Tenerife	Oct.	2	1			Queso blanco	
	Tenerife	Oct.	36		4	Familiar	Queso blanco	Manipuladores por tadores asintom.

Las pastas alimenticias (LEE et al., 1975), las salsas de mesa (DOYLE et al., 1982) y los huevos cocidos (HARBRECHT y BERGDOLL, 1980) también son susceptibles de determinar intoxicación alimentaria por enterotoxinas estafilocócicas.

A.7.3. BROTES HABIDOS EN ESPAÑA EN LOS ÚLTIMOS AÑOS

Los brotes que se han denunciado al Ministerio de Sanidad y Consumo (1980, 1981, 1982, 1983, 1984, 1985) en los últimos años en nuestro país se resumen en la tabla 18. En nuestro país ocupan el segundo lugar en cuanto a importancia se refiere entre aquellas enfermedades transmitidas por alimentos, tras aquellas provocadas por salmonelas.

B. MATERIALES Y METODOS

B.1. LUGAR DE TRABAJO

El trabajo que ahora presentamos se llevó a cabo casi en su totalidad en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de Madrid. Sin embargo, la mayor parte de la obtención y purificación de antisueros específicos así como la conjugación de los anticuerpos con peroxidasa se realizó en el Food Research Institute, adscrito a la Universidad de Wisconsin-Madison (EE.UU.).

B.2. MATERIALES

B.2.1. MATERIAL DE LABORATORIO

El material de laboratorio empleado es el habitual en este tipo de experiencias. Se han utilizado placas de petri, pipetas de diferentes graduaciones, tubos de diversos tamaños, placas de microtitulación, micropipetas digitales y

multicanales, columnas de cromatografía, jeringuillas, etc.

También los aparatos deben ser considerados habituales en un laboratorio de Microbiología. Sin pretender enumerarlos todos citaremos un autoclave, horno de Pasteur, estufa de incubación a 37° C, cámara de refrigeración a 4°C, arcón congelador de -20° C, centrífugas, baños de agua, agitadores magnéticos y orbitales, balanzas, etc. Pero hacemos especial hincapié en el uso de un lector automático de ELISA, en el equipo de cromatografía, y en el espectrofotómetro.

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron seleccionados con el objeto básico de realizar recuentos y comprobar las características de cultivo de los microorganismos. Así mismo también se han empleado con propósito muy particular agar de inmunodifusión y otros pero creemos más conveniente detallarlos en cada apartado concreto. Los reactivos utilizados han sido de grado analítico o similar.

B.2.2. MUESTRAS DE ALIMENTOS

El estudio se centró en los parámetros de producción de enterotoxinas en tres alimentos de distinto origen. Por una parte, una salsa de mesa, la mayonesa, tanto de procedencia industrial como preparada en el propio Departamento; por otra, dos derivados lácteos, la leche condensada, siempre de

origen comercial, y el queso de tipo manchego, elaborado en el Departamento.

B.2.2.a. Quesos tipo Manchego.

Los materiales empleados en la fabricación del queso fueron bien cedidos amablemente por la Central Quesera, S.A. o bien de origen comercial.

* Leche: recibida en la empresa "La Central Quesera, S.A.", procedente de diversas regiones de la geografía española, se utilizó leche de mezcla en las proporciones

- . especie ovina..... 15%
- . especie caprina..... 35%
- . especie bovina..... 50%

Las características físico-químicas de la leche empleada fueron analizadas por un aparato MilkoScan (203 B) y se detallan a continuación:

- . materia grasa..... 4.30 - 4.33%
- . proteína..... 3.62 - 3.71%
- . lactosa..... 4.36 - 4.40%
- . extracto seco total..12.85 -13.06%

El tratamiento térmico al que se sometió la leche antes de su procesamiento en queso fue de pasteurización a 72° C durante 15 segundos en un

pasterizador de placas (APV) con capacidad para 25.000 L en el que la leche sufría un tratamiento de 72°C durante 16 segundos.

Posteriormente, la leche era refrigerada a 4°C en la propia central lechera y transportada hacia el laboratorio en cántaras higienizadas de cierre no hermético de 40 L de capacidad en un vehículo no dotado de condiciones isotérmicas. El plazo de tiempo que duraba este transporte no excedió nunca de 45 minutos.

A su recepción en el laboratorio se procedía a verificar el valor de pH.

* Cloruro cálcico (Merck)

* Cultivo láctico "starter": comercializado por Chr. Hansen (Copenhague, Dinamarca), expendido en forma de polvo de cultivo liofilizado, para preparación del cultivo madre (Dri-Vac). El cultivo empleado por nosotros (CH-N 01) presentaba las siguientes características:

- . células viables por gramo..... $1-2 \times 10^9$
- . tipo de cultivo..... BD(DL)
- . composición del cultivo reactivado:
 - . 1-5% Streptococcus lactis

- . 75-80 % Strept. cremoris
- . 10-15 % Strept. diacetylactis
- . 5-10 % Leuconostoc cremoris
- . Título.....80 5 ml±0.1N NaOH/100 ml
- . Actividad..... 4.9± 0.1
- . Producción de aroma..... alta
- . Producción de CO₂..... alta
- . Proteólisis..... media
- . Tolerancia a la sal
 - . máximo desarrollo..... 4.0% ClNa
 - . inhibición del desarrollo..... 6.5% ClNa

En una primera etapa se procedía a suspender el producto liofilizado contenido en un sobre en 1500 ml de leche esterilizada, incubando después a 22°C durante 24 h, tras las cuales se distribuyó en alícuotas de 50 ml que fueron congeladas a -20°C. Para cada uno de los lotes de queso se descongelaba una alícuota y se agregaba a 750 ml de leche esterilizada de vaca, incubando igualmente a 22°C durante 22-26 h.

* Cuajo (Chr. Hansen) de fuerza 1:100.000.
Para su preparación se disolvía la cantidad requerida en 20 ml de agua destilada estéril a 50°C y se añadía inmediatamente a la leche.

El equipo que se utilizó constaba de:

- * Lira: para cortar la cuajada se empleo una lira fabricada con madera de pino de sección cuadrada de 22 mm de lado, y alambre especial para este instrumento. La longitud total fue de 30 cm y la distancia entre los alambres de 1 cm.

- * Moldes: se utilizaron moldes cilíndricos de plástico de dos dimensiones diferentes (Figura M1):

- + Grandes (G):

- . diámetro externo..... 184 mm
 - . diámetro interno..... 167 mm
 - . altura interior..... 115 mm
 - . altura exterior..... 123 mm

- Dotados de una pieza interior extraíble, igualmente de plástico, de 65 mm de espesor, en forma de cilindro no continuo para un perfecto ajuste dentro del molde.

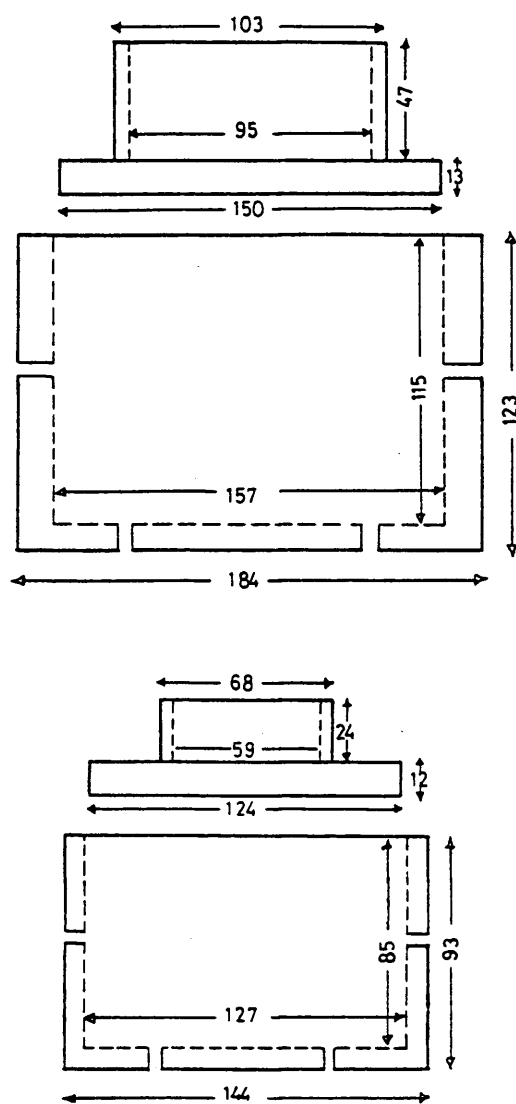
- . Tapa:

- . diámetro..... 150 mm
 - . sección..... 13 mm

- + Pequeños (P):

- . diámetro exterior..... 144 mm
 - . diámetro interior..... 127 mm
 - . altura exterior..... 93 mm
 - . altura interior..... 85 mm
 - . Tapa:

Figura M1: Moldes para la elaboración de los quesos.



Todas las medidas se expresan en mm.

. diámetro..... 124 mm

. sección..... 12 mm

Ambos tipos de moldes estaban provistos de orificios tanto en su fondo como en las paredes laterales para facilitar el desuerado. Las tapas disponían así mismo de unos apéndices cilíndricos huecos para posibilitar la retirada de las mismas y la distribución de las presiones. El peso de los quesos preparados en dichos moldes fue de 1100-1200 g en los grandes, y de 650-750 g en los pequeños.

* Cheesecloth: manufacturados en lino, cuadrados de 55 cm de lado.

* Solución de salmuera: de 25 grados Beaumè.

Otro material empleado en la fabricación de los quesos incluyó un cucharón de 60 cm de largo de latón, utilizado para agitar la leche tras la adición de los diversos componentes, un colador grande de cocina de aluminio, con forma cónica, cuyos orificios tenían un diámetro de 1.2 mm, así como recipientes de plástico de 25 L de capacidad en forma de cono truncado con las medidas siguientes:

. altura..... 30 cm

. diámetro superior..... 38 cm

. diámetro inferior..... 30 cm

Para la toma de muestras se utilizó una sonda de queso, de

acero inoxidable con mango de madera, cuya longitud era de 124 mm.

B.2.2.b. Mayonesa.

a) Comerciales: se emplearon dos marcas diferentes (denominadas A y B) de mayonesas comerciales que fueron obtenidas en establecimientos de venta al público y utilizadas antes de su fecha de caducidad. Los envases eran de vidrio, siendo su peso neto de 700 g.

b) Caseras: fueron preparadas en el laboratorio, a base de los ingredientes siguientes:

* Aceite: se eligieron dos tipos de aceites que se adquirían en comercios. Debido a la ausencia de disponibilidad permanente del tipo inicial de aceite utilizado en el mercado, hubo que utilizar varias marcas diferentes, si bien la mayoría de los estudios se realizaron preparando el producto con aceite de una sola marca para cada tipo. No se verificaron estudios comparativos entre las diferentes marcas de aceite. Siempre se utilizaron como mínimo un mes antes de su fecha de caducidad.

. de girasol: de calidad "refinado". La acidez máxima indicada era 0.2°. Fueron dos las marcas empleadas.

. de oliva: mezcla de aceite de oliva virgen y de aceite de oliva refinado. La acidez máxima indicada fue en unos casos de 0.4° y en otros de 0.8°. Se emplearon dos marcas.

* Vinagre de vino.

* Huevos: se emplearon huevos frescos de gallina de primera calidad (60 g), adquiridos en la granja de la Escuela Superior de Agrónomos.

* Sal

* Jarabe de sacarosa: añadido a la mayonesa una vez preparada para disminuir su viscosidad y mejorar la manejabilidad. Se preparó al 62.5% (p/v), añadiendo 625 g de azúcar comercial a 375 ml de agua destilada, según se agitaba en una placa calefactora dotada de agitador magnético hasta la obtención de un jarabe transparente.

Los utensilios y material utilizado en la preparación de estas mayonesas fue:

* Homegenizador de brazo vertical (Braun, modelo Vario).

* Botes de plástico translúcido de 200 ml de

capacidad (100 x 55 mm), dotados de tapón de plástico con rosca.

B.2.2.c. Leche condensada.

La leche condensada siempre tuvo origen comercial. Se emplearon cuatro marcas diferentes, designadas de la A a la D, si bien, la mayoría de los estudios sobre el efecto de las variaciones de los distintos parámetros se realizaron en la marca A. Se utilizaron envases de 700 g y siempre se estudiaron dentro del mismo trimestre en que había sido envasado el producto.

B.2.3. CEPAS DE Staphylococcus aureus

B.2.3.a. Cepas empleadas

A fin de establecer los parámetros de producción de las distintas enterotoxinas se inocularon cepas productoras de las mismas en los alimentos. Estas cepas son las que se enumeran en la tabla Mi, detallándose así mismo las enterotoxinas sintetizadas por cada una de ellas.

B.2.3.b. Material para verificar la producción de

Tabla M1: Cepas de *S.aureus* inoculadas en los distintos alimentos con indicación de las enterotoxinas producidas por cada una.

Cepa	Enterotoxina producida	Alimento inoculado				Queso tipo Manchego	Origen
		Mayonesa	Leche condensada				
100	EEA	*	*		*	Pastel (1932)	
196E	EEA		*				
161	EEA		*				
S6	EEB EEA	*	*		*		
350	EEB	*					
379	EEB	*	*				
1173	EEB	*					
137	EEC ₁	*	*		*	Humano (Absceso) (1933)	
1143	EEC ₁	*				Humano (recto)	
361	EEC ₂ EED				*	Pollo	
472	EED	*	*		*		
326	EEE	*	*			Chicago Public Health Dept. (1960) tetraxini de pollo y salmón	
1183	EEC ₃ EEF ₃	*				Humano (vagina)	
913	EEA EEC ₂	*				Quisquillas (Gran Bretaña)	

enterotoxinas

Se siguió la técnica de celofán sobre agar (HALLANDER et al., 1965) para lo cual se empleó:

* Tubo de diálisis (Spectrapor) de 73 mm de diámetro inflado y 115 de diámetro plano, cuya pared era de un grosor de 0.074 mm.

* Agar de infusión de corazón y cerebro: la composición es la misma que la infusión de corazón y cerebro expuesta en el apartado B.2.4.a., a la que se incorpora 15 g de agar bacteriológico (Oxoid). Se calienta en baño de agua en ebullición hasta la total disolución de los componentes y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 15 min. Tras enfriar el medio de cultivo hasta 70-75°C, se distribuye en placas de petri de plástico estériles.

* PO_4HNa_2 (0.01M, pH 7.2)

. $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.38 g

. agua destilada..... 1000 ml

Se disuelve la sal en el agua y se ajusta el pH con ClH 1N.

B.2.4. MATERIAL PARA EL RECuento DE MICROORGANISMOS

B.2.4.a. Medios de cultivo.

* Infusión de corazón y cerebro (BHI) (ADSA=MICRO):

Composición

- . extracto de corazón.....5.0 g
- . extracto de cerebro.....12.5 g
- . proteosa peptona.....10.0 g
- . dextrosa.....2.0 g
- . cloruro sódico.....5.0 g
- . fosfato disódico.....2.5 g

Preparación: se suspenden 37 g del producto deshidratado en 1000 ml de agua destilada y tras mezclarlos concienzudamente se distribuyen en tubos. Se esteriliza el medio a 121°C durante 15 min.

* BHI-leche:

Composición y preparación:

- BHI: se pesan 37 g del medio descrito anteriormente, resuspendiéndose en 1000 ml de agua destilada y distribuyendo en tubos a razón de 5 ml por tubo.

- leche descremada en polvo (Nestlé): tras diluir 100 g en 1000 ml de agua se procede igualmente a distribuir en tubos con el mismo

volumen que en el caso anterior.

Una vez esterilizado en autoclave a 115°C durante 15 minutos se procede a incorporar en condiciones asépticas cada tubo de BHI sobre cada tubo de leche.

Como medio de cultivo selectivo se ha empleado el agar de Baird-Parker, cuya composición es la siguiente:

* Agar de Baird-Parker:

Composición

- Medio base (ADSA=MICRO)

- . Triptona.....10.0 g
- . Extracto de carne.....5.0 g
- . Extracto de levadura.....1.0 g
- . Piruvato sódico.....10.0 g
- . Glicocola.....12.0 g
- . Cloruro de litio.....5.0 g
- . Agar.....17.0 g

- solución de telurito potásico (1%)

- . Telurito potásico.....1.0 g
- . agua destilada.....100 ml

Preparación: Tras suspender las cantidades pesadas del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada se lleva a ebullición. Se esteriliza en



autoclave a 121°C durante 15 minutos y se enfría a 45-50 °C. Una vez a esta temperatura se incorpora una yema de huevo asépticamente separada de la albúmina y previamente diluida en 10 ml de agua de peptona estéril al 1%. También se adicionan 10 ml de telurito potásico al 1%, esterilizando a través de un filtro acoplable a jeringuilla (Sartorius, Minisart, 0.22 µm). Se mezclan cuidadosamente todos los componentes y se distribuye en placas de petri, a razón de 12 a 15 ml/placa.

* Agar de recuento en placa (MICRO=ADSA):

Composición

. Peptona de caseína.....	5.0 g
. Extracto de levadura.....	2.5 g
. Dextrosa.....	1.0 g
. Agar.....	15.0 g

Preparación: Se procede como se expone arriba.

* Agar sangre

- Agar base para agar sangre (MICRO=ADSA):

Composición

. Peptona de caseína.....	12.0 g
. Peptona de carne.....	11.0 g
. Almidón.....	1.5 g
. Cloruro sódico.....	5.0 g
. Agar.....	15.0 g

. Agua destilada.....950.0 ml

- Sangre de carnero desfibrinada (Materiales y Reactivos) envasada en frascos de 100 ml.

Preparación: Tras llevar el medio a ebullición se esteriliza a 121°C durante 15 min. Se enfría a 45 ó 50°C y se añaden 50 ml de sangre desfibrinada de carnero. Se mezcla cuidadosamente y se distribuye en placas.

* Medio propuesto por Nuñez (1980):

Composición

. Glucosa..... 5.0 g
. Bacto peptona (Difco)..... 5.0 g
. Extracto de levadura (Oxoid)..... 5.0 g
. Extracto de carne (Oxoid)..... 5.0 g
. Fosfato disódico..... 2.0 g
. Agar (Oxoid)..... 10 g

Preparación: tras pesar los componentes se disuelven en 1000 ml de agua destilada, procediendo a ajustar el pH a 7.0 para esterilizar a continuación en autoclave a 121° C durante 20 minutos.

B.2.4.b. Diluyente

Como diluyente se ha empleado en todos los casos agua de peptona al 1%.

Composición:

. Bacto peptona (Difco).....10.0 g
. agua destilada.....1000 ml

Preparación: Tras disolver las cantidades precisas se distribuye en tubos a razón de 9 ó 10 ml en cada uno, que son esterilizados a 121°C durante 15 minutos.

Para las diluciones realizadas en las muestras de mayonesa y de queso se adicionó Tween 20 (Merck) en la proporción 0.1%.

B.2.5. MATERIAL PARA LA PRODUCCION DE ANTISUEROS ESPECIFICOS

Los reactivos que se utilizaron para las pruebas serológicas fueron en parte cedidos por el Dr. Bergdoll (Food Research Institute, Universidad de Wisconsin, Madison) y en parte producidos por nosotros mismos, bien en el centro anterior así como en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria. El material, tanto biológico como químico y de laboratorio, empleado fue el que a continuación

detallamos.

B.2.5.a. Animales de experimentación

Se utilizaron conejos hembra de raza Nueva Zelanda de tres meses de edad y un peso aproximado de 3 kg al comenzar la experiencia obtenidos de una granja diplomada, adscrita a la Universidad de Wisconsin en Madison (EE.UU.) o de la granja del CRIDA 06. En el Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de Madrid se hicieron tres lotes.

Fueron alojados en jaulas de acero inoxidable elevadas del suelo y dotadas de bebederos automáticos y comederos acoplables con tolva. Tanto el suelo como las paredes y el techo de las jaulas estaba conformado por un enrejado que permitía unos orificios cuadrados de 2 cm². Dichas jaulas se ubicaban en los boxes anexos a los laboratorios del Departamento, provistos de luz natural y de calefacción central. La limpieza se efectuaba de forma semanal, excepto en los meses de verano cuando se hacía dos veces por semana, por medio de mangueras acopladas a un grifo de agua corriente, eliminando los residuos por el sumidero del que disponían los boxes.

Los animales eran alimentados con pienso especial para conejos de la firma "SANDERS, S.A.". Las características del mismo son las que se detallan a continuación:

. humedad.....	13.0 %
. proteína bruta.....	16.0 %
. grasa bruta.....	2.3 %
. fibra bruta.....	14.0 %
. almidones.....	24.0 %
. azúcares totales.....	3.6 %
. cenizas totales.....	9.0 %
. vitamina A.....	15000 UI/kg
. vitamina D ₃	2000 UI/kg
. calcio.....	1.6 %
. fósforo.....	0.7 %
. cloruro sódico.....	0.53%
. antioxidante (Reg. DGFA No 24217).....	125 ppm

Las enterotoxinas purificadas de partida fueron amablemente cedidas por el Dr. Bergdoll, siendo su grado de pureza del 95-98%, según se determinó por la presencia de una única banda en geles con dodecil sulfato sódico, así como por una sola línea de precipitado cuando se enfrentaba la toxina pura en placas de difusión doble en gel de agar a anticuerpos específicos igualmente donados por el Dr. Bergdoll.

Otro material empleado en la inoculación de los animales fue FBS 0.01 M, pH 7.2 (cuya composición se ofrece en el apartado B.2.5.b.), adyuvantes completo (ACF) e incompleto de Freund (AiCF) (Difco), jeringuillas estériles de plástico de 5 ml de capacidad (Fabersanitas) y agujas estériles (38x8).

B.2.5.b. Extracción de sangre y obtención del suero

A este fin se utilizó una caja diseñada por nosotros especialmente para este objeto. Dicho contenedor fue fabricado en madera. La abertura era superior, y se cerraba con una tapa articulada por bisagras, ajustándose en la parte craneal con una argolla. Así mismo estaba dotada de dos orificios para la exteriorización de las orejas.

De gran utilidad en la extracción de sangre fueron las agujas de calibre 0.9 desprovistas del cono de plástico de ajuste a la jeringa. El cono se retiraba a la llama con ayuda de unas pinzas y un par de alicates. Posteriormente, se esterilizaban las agujas en el autoclave a 120°C durante 15 minutos.

Los reactivos y materiales restantes incluían xilol, alcohol etílico, algodón hidrófilo y pinzas de presión continua. Se emplearon tubos de ensayo de 143 x 16 mm a los que se podía ajustar tapones de plástico.

B.2.5.c. Titulación del suero.

El material empleado para valorar el nivel de anticuerpos en los sueros extraídos fue de dos tipos: por una parte, se siguió la técnica de doble difusión en placa con sensibilidad óptima. para lo cual se utilizó el material descrito en el

apartado correspondiente (B.2.7.b.); por otra, aplicamos también la técnica de difusión sencilla en tubos. La enumeración y preparación del material empleado para esta última es la que sigue:

* Agar de inmunodifusión:

- diluyente (PBS, 0.02 M, pH 7.4)
 - . $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$2.76 g
 - . ClNa9.0 g
 - . H_2O destilada.....1000 ml
 - . mertiolato sódico (Sigma).....0.1 g

El pH se ajusta a 7.4 con ClH 1N

Preparación: Se diluyen 0.6 g de agar Noble (Difco) en 100 ml del diluyente y se lleva a ebullición en una placa calefactora con agitador. Cuando se obtenga una solución transparente se filtra a través de un papel de filtro Whatman No 2 haciendo uso de un sistema embudo Buchner-matraz Kitasato, con la ayuda de una bomba de vacío para forzar el agar que se filtre más rápidamente y así evitar su solidificación sobre el papel. Posteriormente se distribuyen volúmenes de 30 ml en frascos de 50 ml de capacidad que se pueden almacenar a temperatura ambiente. En el momento de su uso se funde el agar en un baño de agua en ebullición, para así introducirlo en otro en donde la temperatura del agua oscile entre 50 y 52°C.

* Tubos de Oudin. En esta técnica se utilizaron tubos de 5 mm de diámetro interno y 9 cm de longitud. Previamente a su uso se lavaban en una solución detergente y se aclaraban concienzudamente, ya que los restos de cualquier material, orgánico o inorgánico, podían interferir la reacción. Se tomaban 5 ó 6 tubos en la mano y con una pipeta Pasteur a la que se acoplaba un succionador de plástico se añadía, hasta 0.5 cm del borde, agar fundido y enfriado a la temperatura de 50°C. Tras unos instantes se retiraba el agar con la pipeta Pasteur y se reincorporaba al frasco, depositando los tubos en una gradilla sumergida en un baño de agua con hielo, de forma que quedasen cubiertos en 3/4 partes de su longitud. Esta operación se repetía con todos los tubos que se fueran a utilizar en la experiencia. Así las paredes internas quedaban recubiertas y la adhesividad entre el agar-suero, cuya preparación se describe en el apartado B.3.5.c., era perfecta, evitándose que la solución de antígeno se filtrara entre el vidrio y el agar-suero.

A continuación se retiraban los tubos del baño de hielo y se depositaban entre dos hojas de papel de filtro para eliminar la humedad externa. La técnica de la difusión sencilla en gel se describe en el apartado B.3.5.c.

B.2.3.d. Purificación del suero

Los reactivos y productos que se emplearon en esta técnica fueron:

- * Solución saturada de sulfato amónico: para su preparación se añadió a 100 ml de agua destilada $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ hasta que se apreciaba que se había alcanzado el grado de saturación.

- * PBS 0.01M, pH 7.2:

- . $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$1.38 g
 - . ClNa.....9.0 g
 - . Agua destilada.....1000 ml

Tras disolver los componentes se ajusta el pH a 7.2 con ClH 6N. Se conserva a temperatura de refrigeración.

- * ClNa 0.85%, pH 8.0

- * Polietilen glicol 20M (Fluka): Se añade una parte de agua a cada cinco de polietilen glicol. Se mezcla ligeramente con una barrita de vidrio.

- * Buffer carbonato 0.01 M, pH 9.6

- solución A:

- . CO_3HNa2.52 g

- . agua destilada.....3 L
- solución B:
 - . CO_3Na_21.59 g
 - . agua destilada.....1.5 L

Para su preparación se añade la solución B a la solución A a la vez que se mezcla con el agitador magnético hasta alcanzar el pH requerido.

* Columna de vidrio (Fobel) para cromatografía: de 100 x 4 cm, dotada de llave de teflón del tipo de aguja a la que se ajustó un tubo de silicona con otra llave de Mohr con el objeto de facilitar la graduación del flujo.

* Sephacryl S-200 (Pharmacia): su preparación se llevó a término siguiendo las instrucciones del fabricante. Se suspendió 1500 g de resina en 4.5 L de PBS, agitando constantemente con una barra de vidrio durante unos cinco minutos. Tras una hora la resina se había sedimentado, procediéndose a eliminar el buffer. Se efectuó un cálculo aproximado del volumen de resina sedimentada (alrededor de 1700 ml) y se añadió el 30% del mismo de PBS (unos 600 ml), guardando la precaución de que no presentara un aspecto tan espeso que quedaran burbujas atrapadas. La columna se llenó con la resina así preparada, removiéndola en el contenedor con frecuencia con la barrita de vidrio,

a fin de facilitar la suspensión homogénea. La llave de la columna permanecía abierta a todo lo largo del tiempo que duró el llenado.

Una vez incorporada la totalidad de la resina se ajustó el volumen de PBS de forma que su nivel quedara a tres centímetros sobre la superficie de la resina, cerrándose con un tapón de silicona del tamaño adecuado. A través de éste se hizo pasar una aguja para uso parenteral (38 x 8) ajustando en su cono una goma de silicona conectada con un contenedor de 2 L que se rellenaba con el buffer eluyente.

Cada mes se procedía a esterilizar la resina en el autoclave a 121°C durante 15 minutos, rellenando a continuación la columna en la forma descrita.

* Colector de fracciones (Shandon Southern, Modelo 2405) con carrusel para 110 tubos de 120 x 25 mm.

* Espectrofotómetro

* Liofilizador (Speedivac-Gauge, Modelo 85).

* Tubo de diálisis (Serva): se emplearon tubos de diálisis de dos diámetros diferentes:

- . tipo B/32: diámetro plano 10 mm.
- . tipo 27/32: diámetro plano 32 mm.

En ambos casos el radio medio del poro es de 24 angstroms, y el límite de exclusión oscila entre 8000 y 15000 dalton.

Para preparar estos tubos para su uso se cortaban longitudes adecuadas del mismo y se sumergían en un vaso de precipitado con agua en ebullición durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se retiraban del recipiente y frotando ligeramente un extremo se separaban ambas paredes. Se anudaba en el opuesto y se rellenaba con agua corriente a fin de comprobar la ausencia de picaduras. Tras vaciarle de nuevo se procedía a llenarle con la muestra a dializar, anudando el extremo y atando alrededor un cordel del que pendía la identificación.

B.2.5.e. Marcado de las inmunoglobulinas con peroxidasa

Una de las técnicas de detección de enterotoxinas que empleamos fue el método ELISA. Para éste se requería que los anticuerpos estuvieran conjugados con el enzima de elección, que en nuestro caso fue la peroxidasa. Los materiales necesarios para este marcado son los que a continuación se detallan.

- * Peroxidasa (horse-radish peroxidase, HRPD)

(Sigma), tipo VI.

* Bicarbonato sódico 0.3 M, pH 8.1.

. CO_3HNa12.6 g

. agua destilada.....500 ml

El pH se ajusta con ClH 1N y con NaOH 2N.

* Fluorodinitro benceno (FDNB) (Fluka). Se prepara disolviendo 1 g en 100 ml de alcohol absoluto.

* m-Periodato sódico (Sigma) 0.08M: para su preparación disolvimos 0.856 g en 50 ml de agua destilada.

* Etilen glicol (Merck) 0.16M en agua destilada: diluir 0.9 ml de etilen glicol en 9.1 ml de agua destilada.

* Borohidrato sódico (Fluka)

* Buffer carbonato sódico 0.01M, pH 9.5.

- Solución A:

. CO_3HNa0.84 g

. agua destilada.....1000 ml

- Solución B:

. CO_3Na_21.06 g

. agua destilada.....1000 ml

Para su preparación se añade la solución B sobre la solución A a la vez que se agita constantemente, hasta que se alcance el pH deseado.

* Buffer fosfato sódico (PBS) 0.01M, pH 7.2

. $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$1.78 g

. ClNa9.0 g

. agua destilada.....1000 ml

El pH se ajusta con ClH 1N.

* Seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma, RIA grade)

* Agitador orbital (Junior Orbit Shaker, Lab Line Instruments, Inc.)

* Agitador magnético.

B.2.6. MATERIAL PARA LA EXTRACCION DE ENTEROTOXINAS A PARTIR DE LOS ALIMENTOS

Los reactivos que se emplearon para la extracción de enterotoxina a partir de los alimentos fueron los siguientes:

* ClH 6N

* NaOH 5N

* Cloroformo

* Amberlita CG-50: dicha resina de intercambio iónico se preparó suspendiendo 100 g en 1.5 L de agua destilada. Se añadió NaOH 5N con agitación hasta que se alcanzó un pH de 12. Se mantuvo agitando durante una hora, transcurrida la cual se lavó repetidamente con dos litros de agua destilada. La resina lavada volvió a ser suspendida en 1.5 L de agua destilada. Tras repetir el proceso con ClH 6N hasta pH 2.0 se agitó a temperatura ambiente durante una hora y se lavó con 3 L de agua destilada hasta que adquirió el valor de pH de ésta.

Mediante tampón de fosfato sódico 0.005 M y pH 5.6 se equilibró la resina, ajustando el pH con NaOH 5N cuando éste era inferior a este valor.

* Fosfato disódico, 0.15M + ClNa

. $\text{FO}_3\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$26.8 g
. ClNa.....4.5 g
. agua destilada.....500 ml

* Agar purificado (Difco)

* Tripsina (Sigma)

Los aparatos utilizados incluyeron principalmente una bomba de vacío (General Eléctrica), agitadores magnéticos, centrífuga (Sorval, RC-5B), liofilizador (Speedivac-Gauge, Modelo 85). Otro material empleado consistía en tubos de diálisis (Serva, tipo 27/32), matraces Kitasato y embudos Buchner.

B.2.7. MATERIAL PARA EL ANALISIS DE ENTEROTOXINAS

B.2.7.a. Técnica de la doble difusión en gel de agar en microporta

El material empleado es el que se detalla a continuación.

- * Portaobjetos de vidrio de 7.5 x 3.5 cm.

- * Cinta aislante

- * Agar para el recubrimiento de los portas: Se disuelven 2 g de agar bacteriológico (Oxoid) en 1000 ml de agua destilada en ebullición y se agita hasta que se obtenga una solución transparente. Se distribuye en frascos con tapón de rosca de 50 ml de capacidad, y una vez preparados se almacenan a temperatura ambiente. Cuando se requiere el agar se

funde en un baño de agua a 100°C.

* Agar de inmunodifusión:

Composición:

- diluyente:

- . cloruro sódico.....8.5 g
- . mertiolato sódico (Sigma).....0.1 ml
- . barbital sódico (Merck).....8.0 g
- . agua destilada.....1000 ml

Ajustar el pH a 7.4 con ClH 1N.

- agar

- . agar Noble (Difco).....12.0 g
- . diluyente.....1000 ml

Preparación: Se incorpora el agar al diluyente caliente, llevándolo a ebullición sobre un agitador con placa de calentamiento. Cuando se obtenga una solución transparente se filtra a través de papel Whatman No 1 haciendo uso de un embudo Buchner, un matraz Kitasato y una bomba de vacío. Se almacena en frascos de 50 ml a temperatura ambiente hasta su uso.

* Plantilla de plexiglas[®]: cuyas dimensiones y características se detallan en la figura M3.

B.2.7.b. Técnica de doble difusión en gel de agar de sensibilidad óptima en placas (O.S.P.)

Para el desarrollo de esta prueba se utilizó el siguiente material:

- * Placas de petri de plástico de 50 x 12 mm.

- * Agar de inmunodifusión:

Composición:

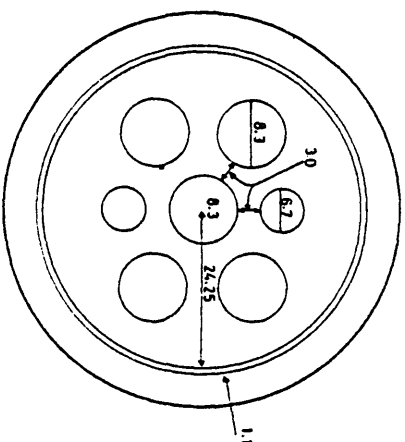
- . agar Noble (Difco).....1.2 g
- . mertiolato sódico (Sigma).....0.01g
- . buffer fosfato salino, 0.01M..100 ml

Preparación: Se disuelve el agar en PBS y se lleva a ebullición hasta la completa disolución del mismo, ajustándose el pH a 7.2 a continuación con ClH 1N. Una vez en este estado se adiciona el mertiolato sódico (timerosal) y se filtra a través de papel Whatman No 2 haciendo uso de un embudo Buchner y de una bomba de vacío. El agar se distribuye en tubos con tapón de rosca, en los que se conserva hasta su utilización.

En el momento de su uso se calienta en baño de agua a 100°C hasta la completa fusión del agar. Se extraen 3 ml con una pipeta y se depositan en la placa de Petri, manteniéndola sobre una superficie perfectamente horizontal hasta su solidificación.

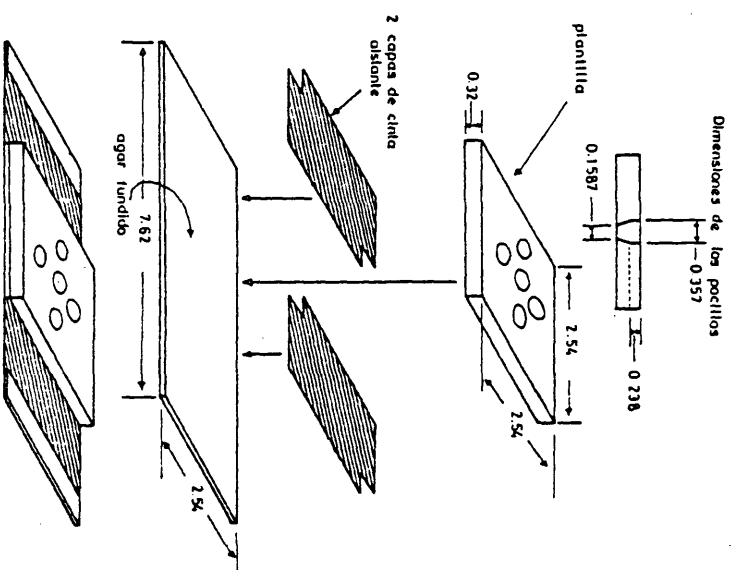
- * Plantilla de Plexiglas®: esta plantilla se confeccionó con una plancha de plástico acrílico de

Figura M2: Planchilla para la doble difusión en gel de agar según la técnica de la "sensibilidad óptima"



Las medidas se expresan en mm.
(tomado de ROBBINS et al., 1974)

Figura M3: Doble difusión en gel de agar. Técnica del "microporator"



Las medidas se expresan en cm.
(tomado de BENNETT y McFILLIPS 1976)

4 mm de espesor. En ella se cortó un círculo de 28 mm y se practicó una incisión circular de 1.1 mm de anchura a 24.25 mm del centro. Una vez realizado este círculo inicial se perforaron ocho pocillos según se detalla en la figura adjunta (M2).

* Sacabocados de 8.3 y 6.7 mm de diámetro.

B.2.7.c. Metodo ELISA

El método de enzimoimmunoensayo que hemos seguido es el denominado ELISA DAS. El material utilizado ha sido:

* Placas de microtitulación (poliestireno) de 96 pocillos con el fondo plano (Limbro).

* Pipeta multicanal (ocho canales) graduable de 50 a 250 µl (Titertek).

* Pipeta digital graduable de 1 a 50 µl (Brand).

* Micropipeta graduable de 50 a 250 µl (Microflow).

* Micropipeta graduable de 200 a 1000 µl (Brand).

* Lector de ELISA (Dynatech, MR 580).

* Contenedores de plástico en forma de pirámide rectangular truncada (Cultek).

Los reactivos empleados fueron:

* Buffer carbonato-bicarbonato 0.1M, pH 9.6.

+ solución A:

. CO_3HNa 1.68 g

. agua destilada.....200 ml

+ solución B:

. CO_3Na_21.06 g

. agua destilada.....200 ml

Para su preparación se añade la solución B sobre la A con agitación constante, hasta que se alcance el valor de pH de 9.6. Si se va a conservar durante mucho tiempo se adiciona azida sódica (0.1%, concentración final) para prevenir la contaminación microbiana.

* PBS 0.01 M, pH 7.2 (descrito en el apartado B.2.5.d.) adicionado de 1 ml de Tween 20 (Merck) por cada litro de solución tampón (PBS-TWN)

* Solución de sustrato:

1.- ABTS (2,3-acino dietil bentiazolina del ácido sulfónico) (Sigma)

+ solución A:

-133-

- . ácido cítrico 50 mM, pH 4.0...5.25 g
- . agua destilada.....500 ml

El pH se ajusta con NaOH 5N.

+ solución B:

- . ABTS 0.6 mM.....33 mg
- . agua destilada.....1 ml

La solución B se prepara inmediatamente antes de su uso, mientras que la A puede almacenarse a temperatura de refrigeración por periodos de tiempo no superiores a los 3 meses. Para la solución de trabajo se agrega 0.5 ml de la solución B a 50 ml de la solución A y se añaden 15 µl de peróxido de hidrogeno (H_2O_2).

2.- OPD (orto-fenilen-diamina) (Sigma)

- solución tampón:

+ solución A:

- . ácido cítrico 0.1M.....2.14 g
- . agua destilada.....100 ml

+ solución B:

- . $PO_4HNa_2 \cdot 2H_2O$, 0.1M.....3.56 g
- . agua destilada.....100 ml

Para su preparación se añade la solución B sobre la A hasta que se obtiene el pH de 5.0. Se conserva a temperatura de refrigeración por periodos de tiempo no superiores a tres meses.

- Solución de uso:

-134-

- . OPD (Sigma).....40 mg
- . solución tampon.....100 ml
- . H_2O_2 (30%).....40 μ l

En general, para todas las pruebas de detección de enterotoxinas y cumpliendo la función de cámaras de humedad se utilizaron contenedores rectangulares de plástico no rígido semiherméticos. En ellos se depositaba papel de filtro humedecido en el fondo, así como en ambos extremos un vaso de precipitado de 25 ml de capacidad lleno de agua.

B.2.B. DETECCIÓN DE RIBONUCLEASAS (DNasa Y TNasa)

Para la detección de este enzima se siguió el método descrito por LACHICA et al. (1971), basado en las propiedades metacromáticas del azul de toluidina. El agar tiene la siguiente composición:

- . agar Noble (Difco)..... 10.0 g
- . DNA (Difco)..... 0.3 g
- . ClNa..... 10.0 g
- . Cl_2Ca 0.55 g
- . tampón tris 0.05M, pH 10.....1000 ml

Para su preparación se calientan todos los ingredientes hasta ebullición, tras lo cual se añaden 6 ml de una solución 0.1M de azul de toluidina con agitación

constante. Se distribuye en tubos con tapón de rosca a razón de 15 ml por tubo, pudiendo almacenarse a temperatura ambiente y en la oscuridad por periodos de 4 meses.

En el momento de su uso, se funde el agar de cada tubo y se vierte el contenido en una placa de petri de 9.0 cm de diámetro. Una vez solidificado el agar se practican pocillos haciendo uso de un sacabocados de 5.5 mm de diámetro, guardando la precaución de no hacerlos muy próximos.

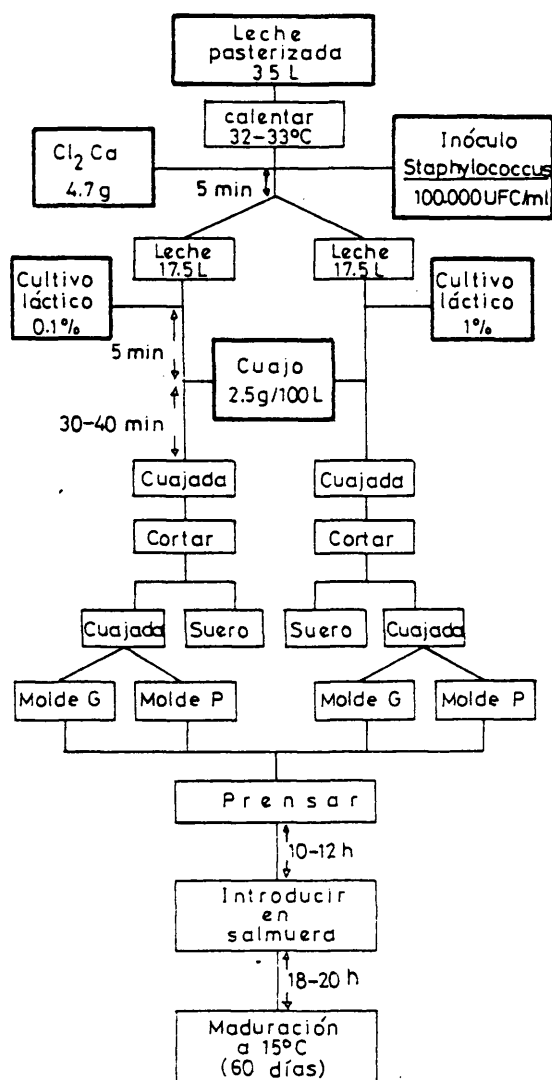
B.3. METODOS

B.3.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE ALIMENTOS

B.3.1.a. Queso tipo manchego (figura M4).

A su llegada al laboratorio, se tomaba una muestra de leche de cada cántara, de donde se verificaba el valor de pH y la flora termorresistente. A continuación, la leche era calentada en las propias cántaras, haciendo uso de un quemador de gas butano, a la vez que se removía constantemente.

Figura M4: Diagrama de flujo de la elaboración de quesos tipo manchego.



Una vez que la leche había alcanzado la temperatura de 32-33° C se procedía a incorporar la cepa de estafilococos deseada que había sido cultivada en BHI-leche durante 18 h a 37°C, en la proporción de 50.000 UFC/ml de leche, calculado en base a lo expuesto en el apartado B.3.2.a. A continuación, se añadía Cl_2Ca (13.5 g por 100 L de leche), siempre agitando cuidadosamente.

El volumen total de leche (35-40 L) se distribuía a partes iguales en dos recipientes, retirándolos de los quemadores de gas e introduciéndolos en un baño donde la temperatura oscilaba entre 55 y 60°C. Se adicionaba el cultivo láctico comercial (preparado según lo descrito anteriormente, apartado B.2.2.a.), en uno de los recipientes al 1% y en el otro al 0.1%. Se mantenía agitando durante 5 minutos, vigilando que la temperatura no excediese de 34°C.

A continuación se procedía a incorporar el cuajo (2.5 g por 100 L) y tras remover durante unos dos o tres minutos, se dejaba reposar, verificando la temperatura de la leche cada 10-15 minutos.

Cuando la leche adquiría tal consistencia que se desprendía de las paredes del contenedor, dejando pasar el suero por esos resquicios, hecho que generalmente tenía lugar entre los 30 y los 40 minutos tras la adición del cuajo, se consideraba que ya estaba coagulada en grado suficiente y se pasaba a

cortarla con una lira de alambre. El tamaño final de los granos de cuajada oscilaba entre 4 y 6 mm.

Acto seguido y haciendo uso del colador, se realizaba una primera eliminación del suero, introduciendo la cuajada en un molde provisto de un paño. Por cada cepa de estafilococos y por cada una de las dos concentraciones de cultivo láctico se utilizaron dos moldes, uno pequeño y otro grande, a fin de estudiar los posibles efectos de una mayor deshidratación.

Una vez llenos los moldes, se doblaba el paño sobre la cuajada y se ponía la tapadera correspondiente. Cuando esta etapa había concluido, se trasladaban los cuatro moldes de cada lote a un cuarto donde la temperatura ambiente oscilaba entre 15 y 17°C, colocándolos bajo una losa de mármol sobre la que se depositaban dos cántaras con 40 L de agua cada una.

Se mantenían así prensados, durante 6 h, tras las cuales se les daba la vuelta. Cuando la salida de suero ya no era visible se eliminaba el molde, introduciendo los quesos en una solución de salmuera de 25°Beaumè, donde permanecían por espacio de 14-18 h. A continuación se retiraban de dicha solución y se dejaban secar brevemente sobre una superficie horizontal en el mismo cuarto.

Además de los quesos inoculados con las distintas cepas de S. aureus se prepararon los siguientes:

- Control: el proceso de elaboración fue idéntico al descrito excepto que no se incorporó ninguna célula estafilocócica y la concentración del cultivo "starter" fue del 1% exclusivamente.

- Un lote de quesos fue inoculado con enterotoxinas A y B crudas, en vez de con estafilococos, a fin de observar las variaciones en la concentración de las mismas y su posible degradación a lo largo del tiempo. Ambas enterotoxinas (lotes AT-11 y BT-10) fueron amablemente suministradas por el Dr. Bergdoll (Madison, Wisconsin) y su concentración fue de 1.7 mg de cada una de ellas por cada 20 L de leche. El proceso de elaboración fue idéntico al mencionado.

- Otro lote de quesos inoculado con la cepa 100, fue preparado sólo con el 1% de cultivo "starter". Una vez coagulada la leche y cortada la cuajada, se procedió a sustituir el suero por 200 ml de tampón fosfato 0.5M, pH 7.7 con arreglo a la siguiente composición:

. $\text{PO}_4\text{HNA}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	35.8 g
. $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	13.7 g
. agua destilada.....	200 ml

Tras 45 minutos se retiró la fase líquida, procediendo a introducir la cuajada en los moldes tal y como se ha descrito.

La maduración en todas las experiencias se llevó a cabo a 15°

C en estufas de temperatura graduable y con un elevado contenido de humedad (aproximadamente el 85-90%). Los quesos fueron parafinados externamente a las dos semanas de su elaboración.

B.3.1.b. Mayonesa

Los estudios de crecimiento, multiplicación de S. aureus enterotoxigénicos y producción de enterotoxinas por los mismos se realizaron en mayonesas de dos orígenes diferentes. Por una parte se inocularon mayonesas comerciales y por otra, mayonesas preparadas en el laboratorio conforme una fórmula casera.

Para la preparación de las mayonesas caseras (figura M5) se emulsionaron dos huevos por cada 500 ml de aceite, añadiendo sal en la cantidad adecuada a fin de que las cualidades organolépticas del producto acabado fueran aceptables para un panel de individuos. La emulsión se realizó con una batidora de brazo vertical.

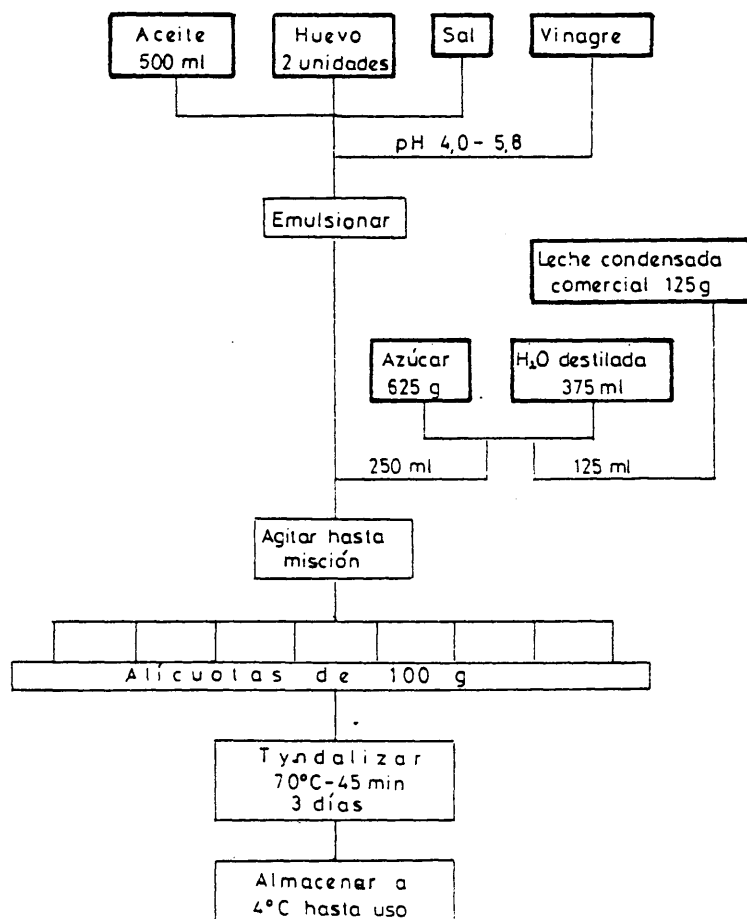
Por la adición de vinagre de vino se ajustó el pH a valores entre 4.0 y 5.8, verificando que mantenía sus propiedades organolépticas (tabla M2).

A fin de facilitar la toma de muestras y la dispersión de los microorganismos en la emulsión se procedió a diluir las

Tabla M2 : Condiciones de pH de las mayonesas preparadas con ambos tipos de aceite y comerciales, y cepas en que se ha investigado dicho efecto.

CEPA	MAYONESAS PREPARADAS CON ACEITE DE OLIVA	MAYONESAS PREPARADAS CON ACEITE DE GIRASOL
S6	4.5 5.2 5.6 4.9 5.3	4.5 5.2 4.8 5.6
100	5.2	5.15
137	4.9 5.3 5.2 5.5	4.0 4.8 4.5 5.2
326		4.0 4.8 4.5 4.9
350	5.8	5.8
379	4.9 5.7	5.5 5.7
472	5.0 5.8	4.0 4.8 5.0 4.5 4.9 5.8
913	5.2	5.2
1143	5.8	5.8
1173	5.0	5.0
1183	5.3	5.3

Figura M 5: Diagrama de flujo de la preparación de las muestras de mayonesas y de leche condensada.



-143-

mayonesas en un jarabe de azúcar al 62.5% (p/v), procediéndose a mezclar la mayonesa y el jarabe en la proporción 2:1, controlando la completa mixtura de ambos.

Se distribuyó la mezcla en alícuotas de 100 g que se introdujeron en botes de plástico de 200 ml de capacidad, cerrándolos cuidadosamente, identificando cada uno de los botes con etiqueta adhesiva donde constara el tipo de aceite empleado, el pH de la mayonesa y el peso de la muestra. En esa misma etiqueta se iba completando con otros datos, tales como la cepa inoculada, la fecha de inoculación, la temperatura a la que se había incubado y el inóculo.

A continuación los botes fueron sometidos a un proceso de tyndalización, para lo que se introdujeron en un baño con agua a 70°C durante 45 min tres días sucesivos, siendo incubados a 37°C en los intervalos. Tras la última fase a 70°C se consideró que su contenido estaba libre de gérmenes, comprobando esta circunstancia en algunos botes, y se conservó en la cámara frigorífica hasta su empleo, pero nunca por periodos de tiempo superiores a las dos semanas.

B.3.1.c. Leche condensada

Tras la apertura de los botes de leche condensada comercial se pesaban 100 g en los botes de plástico, añadiendo a continuación jarabe de sacarosa al 62.5% hasta que el peso

final era de 150 g. Se agitaban cuidadosamente los botes para incorporar el jarabe a la leche condensada y se procedía igual que en las mayonesas, tyndalizando con iguales características e identificando cada bote (figura M5).

En otros experimentos se procedió a introducir el inóculo directamente por un orificio perpetrado en el bote de leche condensada, sellándole posteriormente con una soldadura de estaño.

B.3.2. INCUBACION Y ESTUDIO

B.3.2.a. Inoculación

Se inocularon las muestras de mayonesa y de leche condensada con distintas concentraciones de microorganismos por gramo. El inóculo consistía en un cultivo de 18 h en BHI de la cepa a estudiar. La concentración deseada se calculó en base a una curva trazada con la cepa 196-E, realizándose las valoraciones en un aparato Spectronic-68 (Bausch y Lomb) a 924 nm de longitud de onda. Las concentraciones del inóculo elegidas fueron 50.000, 100.000, 500.000 y 1.000.000 unidades formadoras de colonias (UFC)/g. En las muestras de leche condensada se mantuvieron estas concentraciones en todas las cepas. En las de mayonesa se hicieron unas experiencias

-145-

iniciales, estudiando además inóculos de 1.000 y de 10.000 UFC/g con la cepa 472, aunque posteriormente, las demás experiencias se realizaron con inóculos iniciales de 100.000 UFC/g.

B.3.2.b. Parámetros de incubación

- . Temperatura de incubación: 22, 28, 37 y 44°C.
- . Tiempos de incubación: 1, 4, 7, 11 y 14 días.

No obstante, y a pesar de lo expuesto, se trazó un esquema de experiencias según el cual se concebía como patrón 100.000 UFC/g, 37 °C y 7 días modificándose sólo uno de estos valores cada vez. De esta forma se tiene, por ejemplo, que las experiencias a 44°C se realizaron sometiendo las muestras de mayonesa a incubación durante 7 días, y los estudios del desarrollo de los microorganismos y producción de enterotoxina en 4 días se realizaron a 37°C. Las muestras que se estudiaron a cada temperatura, en cada tiempo y con cada inóculo se detallan en la tabla M3.

B.3.2.c. Toma de muestras y técnica de recuento (figura M6)

Diariamente durante los siete primeros días y en días alternos en los sucesivos se tomó de cada uno de los botes que componía la experiencia cuyo contenido había sido agitado

Tabla M3: Características de incubación de las distintas muestras de leche condensada y de mayonesa.

Muestras Nº			Características de incubación		
Leche condensada	Mayonesa		Temperatura (°C)	Inóculo (UFC/g)	Tiempo (días)
	Oliva	Girasol			
1-2	1-2	3-4	22	100.000	7
3-4	5-6	7-8	28	100.000	7
5-6	9-10	11-12	37	100.000	7
7-8	13-14	15-16	42 / 44 *	100.000	7
9-10			37	50.000	7
11-12			37	500.000	7
13-14			37	1.000.000	7
15-16	17-18	19-20	37	100.000	1
17-18	21-22	23-24	37	100.000	4
19-20	25-26	27-28	37	100.000	11
21-22	29-30	31-32	37	100.000	14

*, 42°C: leche condensada.
 *, 44°C: mayonesa.

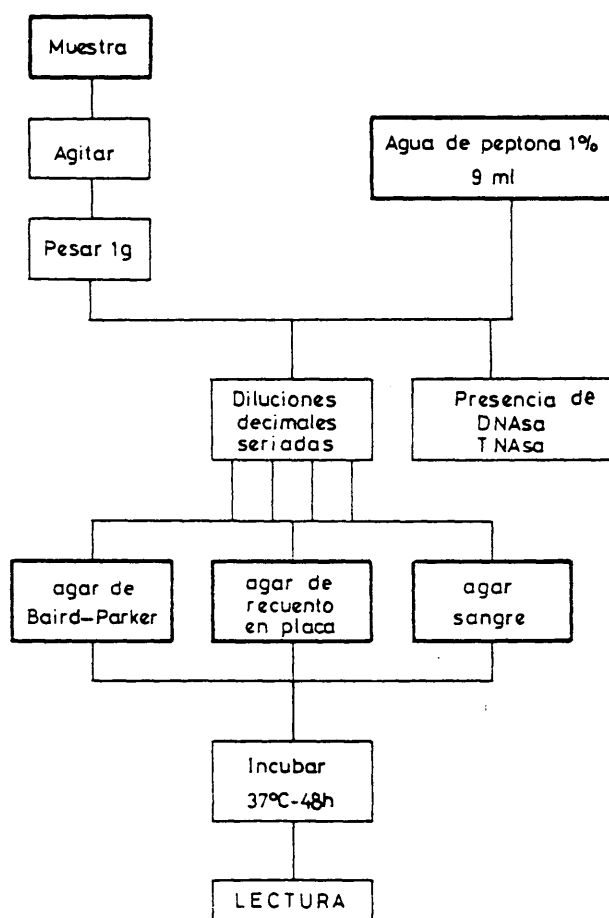
vigorosamente aproximadamente 1 g con la pipeta digital adecuada. Tras suspenderlo en agua de peptona al 1%, se procedió inmediatamente a hacer diluciones decimales o centesimales seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} , depositándose 100 μ l de cada dilución en la superficie de los medios sólidos de recuento (Baird-Parker, agar de recuento en placa, y agar sangre), extendiéndolos con un asa de Drigalski.

La toma de muestras en los experimentos con queso se realizó retirando de forma aséptica, con una sonda de quesos, unos 10 g del producto, incidiendo tanto en el ecuador como en las porciones sub y supraecuatoriales con dicho aparato hacia el centro del queso. Las tomas se realizaron al principio de forma diaria, para distanciarlas más en el tiempo tras los 10 primeros días de maduración, alternando siempre los quesos pequeños y los grandes. El orificio practicado en el queso se rellenaba con parafina fundida estéril.

La muestra se introducía en un contenedor estéril de plástico de 40 ml de capacidad, incorporando 20 ml de BHI-Tween y congelándola. Unas tres o cuatro horas después, se extraía del congelador y se trituraba, antes de que se descongelara, con una espátula de acero inoxidable esterilizada a la llama, de forma que se formara una suspensión pulverulenta, a partir de la cual se realizaron todas las determinaciones analíticas de los distintos quesos.

Una vez incubado a 37°C durante 48 h se llevó a efecto el recuento de las colonias de estafilococos que exhibían la

Figura M 6: Diagrama de flujo del tratamiento de las muestras de alimento.



morfología típica en aquellas placas donde el número oscilaba entre 30 y 300 UFC. En agar de Baird-Parker sólo se contaron aquellas colonias circulares, de bordes enteros, y convexas, que presentaban un brillo metálico negro y un halo de precipitación alrededor. En agar de recuento en placa, las colonias que se registraban eran bien amarillas o bien blancas nacaradas, de bordes enteros y convexas. En agar sangre, las colonias presentaban halos de hemólisis típicos, así como la pigmentación característica de la cepa.

Tanto las experiencias como los recuentos siempre se realizaron por duplicado.

B.3.3. INDUCCION A LA PRODUCCION DE ENTEROTOXINAS

Previamente a su inoculación en las muestras de alimentos se verificaba el poder enterotoxigénico de las cepas a emplear. Esta investigación se realizó en dos pasos sucesivos. En el primero, las cepas se cultivaron según métodos considerados de rendimiento óptimo para la producción de enterotoxinas. En el segundo, se comprobaba la producción de las distintas enterotoxinas por técnicas serológicas de inmunodifusión en gel de agar, que serán detalladas en el apartado oportuno (B.3.6.b.).

En la producción de enterotoxinas se siguió el método del

celofán sobre agar, descrito por HALLANDER (1965) y modificado por JARVIS y LAWRENCE (1970). Para su consecución se cortó papel de celofán procedente de un tubo de diálisis (Spectrapor, 73 mm) en círculos de tamaño algo superior al de una placa de petri de 9 cm de diámetro. Alternando un círculo de celofán con otro de igual tamaño de papel de filtro humedecido para evitar el arrugamiento, se colocaban en una placa de petri de vidrio, esterilizándose en el autoclave a 120°C durante 15 minutos. Una vez estériles se depositaban los círculos de celofán asepticamente, ayudándose de dos pares de pinzas, sobre la superficie de placas de agar BHI adicionado del 0.5% de piruvato sódico, ejerciendo presión con las pinzas para que la adhesión al medio fuera correcta.

La siembra de las placas se realizó depositando sobre la membrana 200 µl de un cultivo en BHI de 48-72 h de la cepa a estudiar, extendiendo con un asa de Drigalski.

Se incubaban las placas a 37°C durante 48 h en posición no invertida, al cabo de las cuales se retiraban las células y los productos que se hallaban sobre la membrana por la adición de 2.5 ml de una solución de PO_4HNa_2 al 0.01M, arrastrándose mediante un asa de Drigalski. La suspensión arrastrada se sedimentó en una centrífuga de mesa a 2.000 rpm durante 10 minutos, analizándose el sobrenadante para detectar la presencia de enterotoxinas.

Las membranas de celofán eran recicladas, lavándolas de forma

extensiva primero con agua corriente, posteriormente en agua destilada, para finalizar en agua desionizada. Se conservaban congeladas hasta su uso.

B.3.4. METODO DE EXTRACCION DE ENTEROTOXINA A PARTIR DE LOS ALIMENTOS (Figura MB)

Para la extracción de las enterotoxinas de los alimentos se siguió el método descrito por REISER et al. (1974). Describiremos más detalladamente el seguido para la mayonesa indicando a continuación las variaciones pertinentes que hayan sido realizadas en los otros dos alimentos (queso de tipo manchego y leche condensada).

B.3.4.a. Primera fase

Se añadieron 30 ml de agua destilada a aproximadamente 100 g de mayonesa o de leche condensada, mientras que para las muestras de queso se utilizaron 100 ml. Cuando la muestra era semisólida se agitó vigorosamente a fin de conseguir una mezcla íntegra de ambas fases, pero cuando era sólida (queso) hubo que proceder a molturar, sirviéndonos del homogenizador de brazo vertical. A continuación se realizaba una precipitación ácida, ajustando el pH a 4.5 con ClH 6N en aquellos casos en los que este era superior a dicho valor.

Por el contrario, en aquéllos en los que era inferior este paso era obviado.

Vertiendo los 150 g en frascos de acero inoxidable de 280 ml de capacidad específicas para el rotor GSA de Sorvall, se procedió a centrifugar las muestras a 12.000 rpm (23.430xg) durante 25 minutos a 4°C. Se despreciaba el precipitado, ajustándose el sobrenadante a pH 7.5 con NaOH 5N. Tras verificarse el volumen con una probeta se añadía cloroformo para obtener una concentración del 10% v/v (leche condensada) o del 15% v/v (mayonesa y queso), a fin de conseguir una extracción de los lípidos, y se mezcló en un agitador magnético a 100 rpm durante unos 3 a 5 minutos.

Después de someterse a otra centrifugación de iguales características que la anterior (12.000 rpm durante 25 min), el sobrenadante fue filtrado lentamente a través de una tela de batista a fin de retirar el cloroformo.

Se ajustó de nuevo el pH a 4.5 con ClH 6N y en los casos en que se formó un precipitado se volvió a centrifugar. Tras volver a ajustar el pH a 7.5 con NaOH 5N y de centrifugar si se formaba precipitado se daba por concluida esta etapa. A continuación se concentraba la muestra mediante diálisis frente a Carbowax 20.000 (Fluka), hasta que el volumen era aproximadamente 1/10 ó 1/20 del original.

Para comprobar la presencia de enterotoxina mediante la

técnica ELISA no se requerían pasos ulteriores pero si el método de detección era inmunodifusión doble era preciso purificar el extracto por los pasos que se detallan a continuación.

B.3.4.b. Segunda fase

Sólo se prosiguió con esta segunda fase con las muestras de leche condensada, que fueron analizadas por el método de la doble difusión en gel de agar en microporta. Se añadían 20 ml de la resina de intercambio iónico Amberlita CG-50, que previamente había sido tratada y equilibrada a pH entre 5.4 y 5.9, por cada 100 ml de extracto y se agitaba durante una hora a 4°C.

Transcurrido este tiempo se retiraba la resina aplicando vacío a un sistema matraz Kitasato-embudo Buchner sobre el que se ajustaban dos capas de papel de filtro Whatman No 2. Se lavaba la resina con 200 ml de fosfato buffer salino (PBS) 0.15 M, pH 5.9, diluido 1 a 10, despreciándose el lavado.

La resina se suspendía en 30 ml de fosfato disódico 0.15 M con 0.9% de cloruro sódico, ajustándose el pH a 6.8. Tras agitar durante 45 minutos a 4°C se consideró que la toxina se había eluido de la resina.

Por el sistema anteriormente mencionado Kitasato-Buchner se

separaba la resina de la elución, conservando esta última.

Se añadía 1 g de agar purificado a la elución y se agitaba durante una hora a 4°C. A continuación se recogía la elución, despreciando el agar haciendo uso de un sistema como el anterior.

El producto de esta última fase (unos 30 ml) se introducía en un tubo de diálisis, depositándolo en una solución concentrada de polietilén glicol 20.000 (aproximadamente dos partes de polietilén glicol por cada una de agua destilada) donde se mantuvo hasta la mañana siguiente en condiciones de refrigeración.

Transcurrido este tiempo se lavaban las paredes externas de los tubos de diálisis con agua del grifo. A fin de desprender la toxina del recubrimiento interior del tubo se introducían en agua tibia durante 10 a 20 minutos.

El contenido del tubo se volcaba en un tubo de centrifuga, aclarando tres veces con agua destilada de forma que el volumen final no excediera de 5 ml.

La última extracción se realizaba con cloroformo, añadiéndose 0.5 ml de este reactivo a los 5 ml de extracto y agitando vigorosamente con un agitador excéntrico.

Se centrifugaba a 20.000 rpm durante 10 min a 4°C.

Figura M7: Diagrama de flujo de la extracción de enterotoxinas a partir de los alimentos.

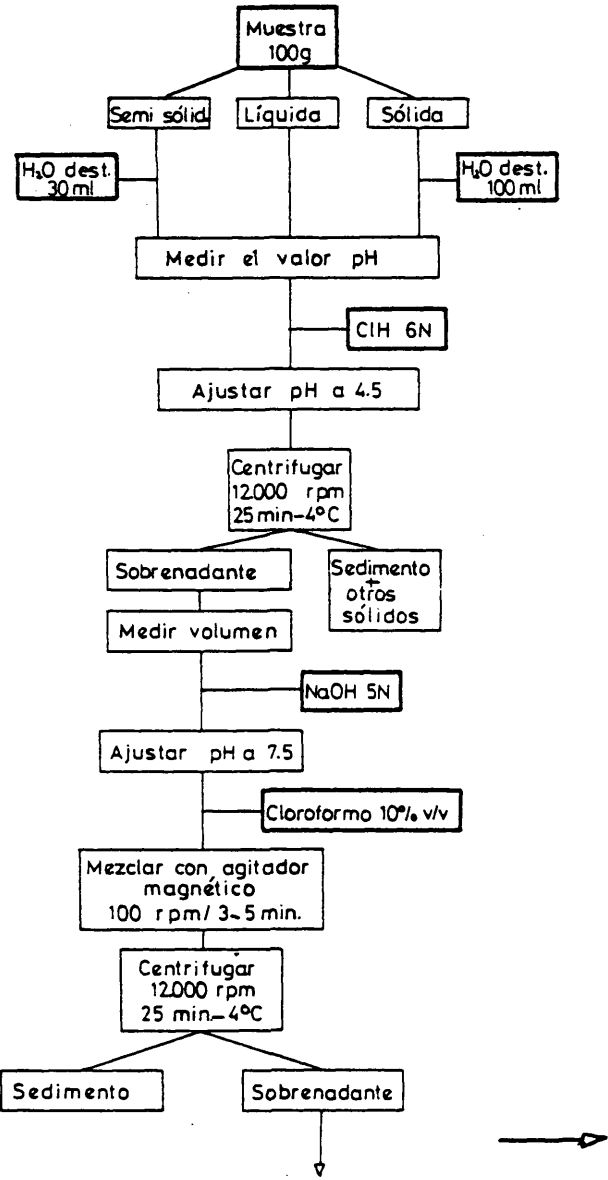


Figura M7: (continuación)

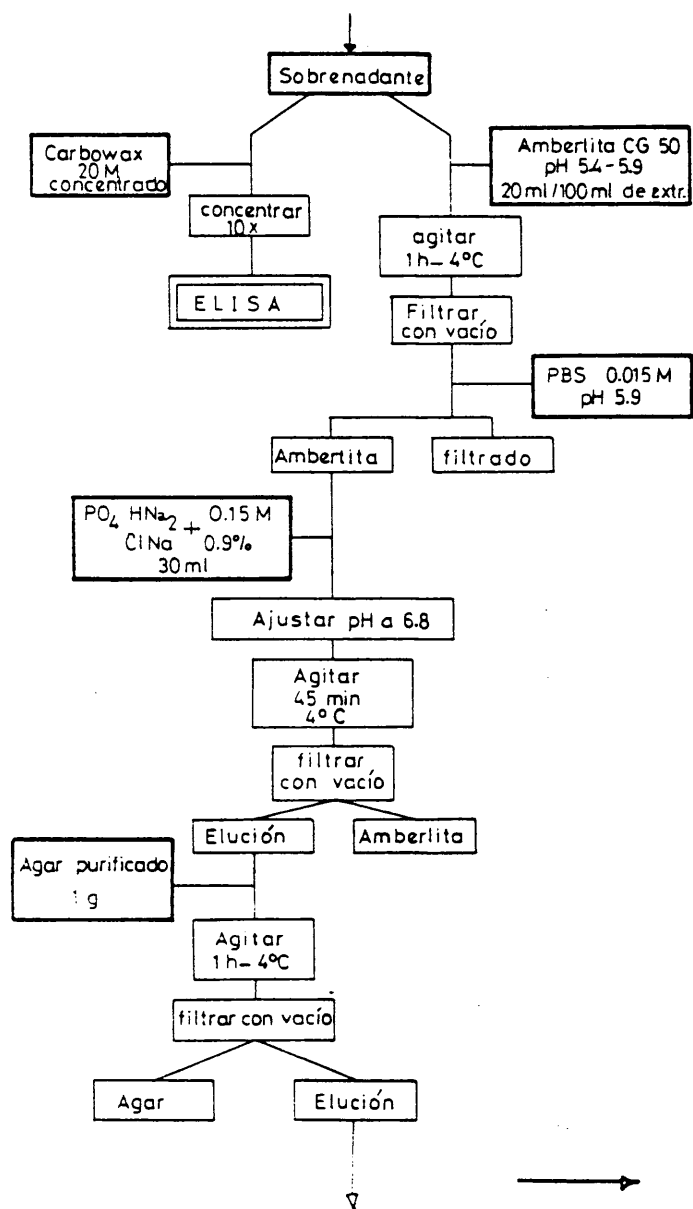
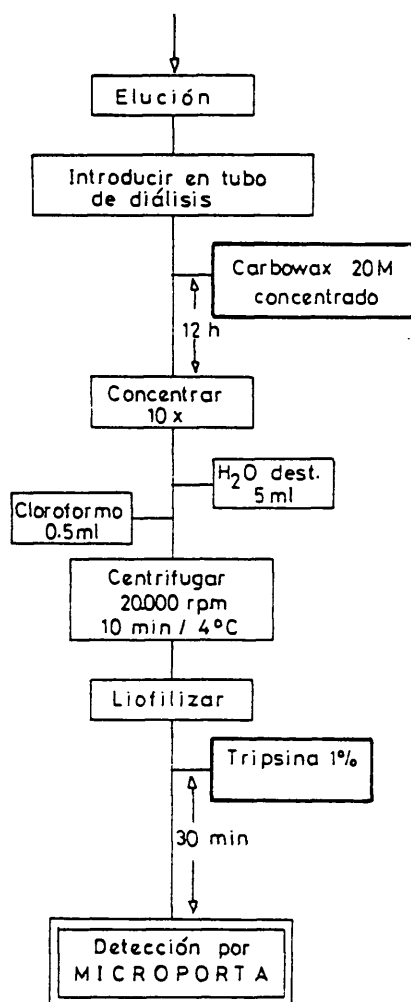


Figura M 7: (continuación)



siguiéndose el proceso con la liofilización de la fase acuosa. El producto deshidratado se disolvía en 0.2 ml de una solución de tripsina al 1% en agua destilada, permitiendo la degradación durante una media hora.

Con este último paso se daba por concluido el proceso, considerándolo ya adecuado para comprobar la presencia de enterotoxina por la técnica del portaobjetos.

B.3.5. METODOS DE PRODUCCION DE REACTIVOS PARA SU EMPLEO EN ELISA

El procedimiento de obtención de los anticuerpos específicos y su conjugación con peroxidasa es el que se detalla a continuación.

B.3.5.a. Inmunización de conejos

Se siguió la técnica descrita por ROBEINS y BERGDOLL (1984), cuyo protocolo se presenta en la tabla M4. Las enterotoxinas purificadas de partica fueron cedidas por el Dr. Bergdoll y su grado de pureza era del 95-99%, según se determinó por la presencia de una sola banda en geles de dodecil sulfato sódico, así como una sola línea de precipitado cuando se enfrentaba la toxina pura en placas de difusión doble en gel

Tabla M4: Protocolo de inmunización en conejos para la obtención de anticuerpos específicos frente a las distintas enterotoxinas estafilocócicas.

días	Tipo de enterotoxina							semana
	EEA	EEB	EEG ₁	EEG ₂	EEG ₃	EED	EEE	
0	3	10	12	10	1	6	1	1
3					3		3	
8	4		20		10		10	2
14				25		14		3
21	5		100			40	20	4
24		50			20		30	
28	10			100	50	120		5
35	25		400	400		260		6
42	50							7
49	100							8
								9
63							50	10
66		60					100	
70		100					350	11
80					60			12
87					300			13

Los valores se expresan en µg totales.

de agar.

Las inoculaciones iniciales de cada enterotoxina se realizaron emulsionando 1 ml de FBS (0.01M, pH 7.2) donde se encontraba diluida la toxina con 1 ml de adyuvante completo de Freund (ACF). En las siguientes se utilizó adyuvante incompleto (AICF) en vez del anteriormente citado. La emulsión se obtenía agitando durante 2-3 minutos la mezcla en un agitador excéntrico. Se consideraba que era correcta si la segunda gota que se vertía en una placa de petri con agua destilada no se dispersaba, sino que permanecía como un glóbulo. Inmediatamente se procedía a inocular 1ml de dicha emulsión por vía subcutánea a cada lado del dorso del conejo, a la altura de la escápula, previo alisamiento del pelo con una torunda empapada en alcohol.

El peso de los animales era seguido cuidadosamente, registrándose el día de la inoculación y los dos posteriores a la misma hora. De evidenciarse una pérdida de peso y que no se recuperaba antes del día programado para la siguiente inoculación, ésta se retrasaba. De igual forma se vigilaba la posible aparición de abscesos, que de observarse, eran tratados precozmente. En ningún momento se privó a los animales de alimento o de bebida.

B.3.5.b. Extracción de la sangre y obtención del suero

Con periodicidad semanal se procedía a sangrar los animales a fin de obtener el suero. Con este propósito, se introducía el animal en la caja diseñada al efecto, extrayéndole las orejas por los orificios correspondientes. Tras depilar el recorrido de la arteria central de la oreja se limpiaba la totalidad de dicho apéndice con alcohol y posteriormente se aplicaba una torunda mojada en xilol en la base de la oreja. Se incidía con una aguja estéril a modo de lanceta a la que se había desprovisto del cono, introducida paralelamente al curso del vaso, permitiendo que la sangre fluyera libremente por el interior de la misma y cayera sobre las paredes internas de un tubo de vidrio previamente esterilizado. Cuando el volumen de la sangre extraída era el deseado (generalmente 25 ml) se ejercía una presión moderada en la base del pabellón auricular con el dedo a la vez que se retiraba la aguja y se aplicaba una torunda de algodón en el lugar de la incisión.

En la cámara de incubación a 37 °C, la sangre desueraba durante 60-90 minutos. A continuación, con una pipeta Pasteur estéril se desprendía el coágulo de las paredes del tubo, almacenándose a 4°C durante 24 h, a fin de que el coágulo se contrajera al máximo y eliminara la totalidad del suero. Transcurrido este tiempo se procedía a verter el suero en tubos estériles con tapón de rosca, depositándose a 4°C los tubos en posición vertical para que se sedimentaran los eritrocitos en suspensión. El almacenamiento definitivo del suero se verificaba a -20° C en un arcón congelador, conservándose en congelación hasta su uso.

B.3.5.c. Titulación del nivel de anticuerpos específicos

Era importante conocer en todo momento la evolución de la inmunización, a fin de seguir la respuesta inmune de cada conejo en concreto, así como para utilizar los sueros de mayor reactividad para su purificación y posterior utilización en el método ELISA. La consecución de este fin se llevó a cabo por dos técnicas distintas.

Por un lado, se utilizó el método de doble difusión en placa con sensibilidad óptima descrito en el apartado B.3.6.b, depositando en el pocillo central 2 µg/ml de la enterotoxina específica, y en los laterales el suero obtenido. Cuando se apreciaba la presencia de una línea de precipitado, se procedía a cuantificar el nivel de anticuerpos del suero.

La cuantificación se efectuó según la técnica de difusión sencilla en gel de agar (WEISS y ROBBINS, 1970), que determina qué dilución del suero problema diluido en agar Noble al 0.3% en tubos de difusión sencilla forma una zona de precipitado de 10 mm de longitud cuando se enfrenta a 10 µg/ml de enterotoxina específica en las condiciones que se detallan a continuación.

En tubos de centelleo (4.5 x 1 cm) se hicieron diluciones dobles seriadas del suero a estudiar en PBS 0.02M, pH 7.4,

teniendo en cuenta que la adición del agar diluía el suero a la mitad. Las diluciones estudiadas de forma rutinaria eran 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160, no siendo necesario en ninguna ocasión ampliar este rango. Para obtenerlas se añadian 200 µl del suero a 1.8 ml del diluyente. Posteriormente se retiraba 1 ml al que se le adicionaba otro de diluyente, mezclando cuidadosamente con la pipeta digital. Esto se repetía otras dos veces, despreciando 1 ml del último tubo. Una vez efectuadas las diluciones se calentaron en un baño de agua a 50°C.

Se fundió el agar Noble (0.6%) introduciéndolo en un recipiente con agua hirviendo, depositando a continuación el frasco que lo contenía en el mismo baño de agua a 50°C. Una vez se consideró que el agar se había enfriado hasta esta temperatura se procedía a incorporar 1 ml a cada uno de los tubos que contenía las diluciones del suero, mezclando con una pipeta Pasteur pero manteniendo la precaución de no introducir burbujas de aire. A continuación se introducían con la misma pipeta aproximadamente 1.5 ml en los tubos de Oudin descritos en el apartado B.2.5.c., cuidando que no se formaran burbujas en el menisco superior.

Tras unos 20 minutos el agar había solidificado completamente y estaba en condiciones para continuar con el resto de la técnica. Haciendo uso de otra pipeta Pasteur se depositaba sobre el agar-suero aproximadamente 1 ml de enterotoxina patrón específica diluida en PBS 0.02M a una concentración de

10 µg/ml.

La incubación se efectuó a 28°C durante 7 días. Transcurrido este tiempo se procedía a medir con una regleta la distancia de la zona de precipitado hasta el menisco, representando en papel semi logarítmico de cuatro ciclos en el eje de las ordenadas los valores registrados, mientras que en el de abscisas la inversa de la dilución del suero. Se trazaba una línea coincidente con los cuatro puntos. El título del suero es aquella dilución que equivale a una zona de precipitación de 10 mm.

B.3.5.d. Purificación del suero

Se siguió la técnica descrita por HEBERT et al. (1973) modificada ligeramente. Tras medir el volumen de suero se añadía una cantidad igual de agua destilada. Se vertía en un vaso de precipitado adecuado y por medio de una barrita magnética se favorecía la agitación lenta y constante de la mezcla, a la que se iba añadiendo gota a gota con una pipeta el mismo volumen que el suero original de una solución de sulfato amónico saturado. A medida que se iba incorporando el sulfato amónico se apreciaba el incremento de la turbidez del suero.

Tras mantener el suero con los demás aditivos a 4°C durante la noche se procedía a centrifugar a 5000 rpm durante 15 minutos a 4 ° C. Se despreciaba el sobrenadante,

redisolviéndose el precipitado en 5 ml de PBS 0.01M. A continuación se introducía el producto en un tubo de celofán (tipo 8/32), dializándose durante 24 h frente a ClNa 0.85%, pH 8.0.

Se extraía cuidadosamente con una pipeta Pasteur y, tras medir la absorbancia a 280 nm, se cargaba la columna, eluyendo con PBS 0.01M, pH 7.2. La velocidad de flujo era aproximadamente 1 ml/min y las fracciones recogidas de 10 ml. Se calculó el volumen de vacío de la columna en 170 ml, por lo tanto los 150 ml iniciales eran despreciados empezando a recogerse a partir de los mismos y considerando el contenido de ese primer tubo como fracción 1.

Una vez obtenidas 80 fracciones se medía la densidad óptica de las mismas a 280 nm de longitud de onda con luz ultravioleta, anotándose los resultados. Estos eran transferidos a papel milimetrado, trazándose la gráfica correspondiente al patrón de elución. De los distintos picos se elegía el que era sospechoso de contener las inmunoglobulinas G y se combinaban las fracciones en un vaso de precipitado de 250 ml de capacidad. La densidad óptica era de nuevo leída, calculándose el porcentaje de proteína recuperada en la fracción IgG según la fórmula

$$\text{mg/ml proteína} = \frac{\text{densidad óptica}}{1.38} \times \frac{1}{\text{dilución}}$$

A continuación se introducían las fracciones combinadas de IgG en un tubo de diálisis, cerrándose los extremos con sendos nudos, y se depositaba en una bandeja que contenía polietilén glicol-20M, con el objeto de que se concentrara.

Transcurridas 12-18 h el volumen inicial se había reducido a $1/5$ ó $1/10$. El tubo era aclarado externamente con agua del grifo y se mantenía 3 ó 4 minutos en agua tibia. A continuación se recogía el contenido en uno de los extremos, presionando con los dedos a fin de arrastrar hacia allí la mayor parte del mismo. Se anudaba de nuevo el tubo, cortando el extremo no utilizado, y se dializaba extensivamente frente a tampón carbonato 0.01M, pH 9.6, cambiando el tampón en repetidas ocasiones.

Se procedía nuevamente a efectuar la lectura de la densidad óptica y se calculaba la cantidad de proteína presente aplicando la fórmula anterior pero multiplicada por la inversa de la dilución realizada a fin de que la lectura entrara dentro de los límites de la escala.

En viales de 2 dram de capacidad se distribuía el volumen correspondiente a 10 y 1 mg de proteína y se congelaban a -20° C para posteriormente proceder a liofilizarlos, paso con el que se daba por concluido el proceso de purificación.

B.3.5.e. Marcado con peroxidasa

Para la conjugación de los anticuerpos con el enzima elegido se siguió la técnica de NAKANE y KAWADI (1974), con ligeras modificaciones en el sentido de reducir el número de pasos, puesto que se observó que no mejoraban la sensibilidad ni determinaban la aparición de reacciones inespecíficas en la técnica. El método es el que a continuación se describe:

Cinco mg de peroxidasa de rábano picante (HRPO - horse radish peroxidase) eran disueltos en 1.0 ml de CO_2HNa 0.3 M, pH 8.1 preparado inmediatamente antes de su uso. Se añadían 0.1 ml de una solución de fluorodinitrobenzenceno al 1% en alcohol absoluto, a fin de bloquear los grupos ϵ - y ξ -amino así como los hidroxilo de la HRPO, y evitar que se conjugara consigo misma, pero permitiendo en vez que formara bases de Schiff con los grupos ϵ - y ξ -amino de las proteínas disponibles.

Una vez agitado suavemente en un agitador orbital durante una hora se adicionaba 1.0 ml de IO_4Na (m-periodato sódico) 0.08M en agua destilada, continuando la agitación durante otros 30 minutos. La oxidación de la porción glucídica de la molécula de HRPO por este compuesto permitía la formación de aldehídos que darían las bases de Schiff, puentes entre el enzima y los anticuerpos.

Se añadía a continuación 1.0 ml de etilen glicol 0.16M en agua destilada, con objeto de frenar la reacción y se

mezclaba por agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se introducía la solución en un tubo de diálisis (tipo 8/32) y se dializaba frente a tres volúmenes de 1 L de buffer carbonato sódico 0.01M, pH 9.5, a 4°C, paso encaminado a restablecer la actividad enzimática perdida.

El día siguiente se añadían 10 mg de IgG purificada de acuerdo con lo expuesto en el apartado anterior, disuelto en 1.0 ml de buffer carbonato 0.01M, pH 9.5 y se mezclaba suavemente por espacio de 2 ó 3 horas a temperatura ambiente. A continuación se añadían 5 mg de BH_4Na (borohidrato sódico), permitiendo que reaccionaran durante 3 a 18 h a 4°C, y así estabilizar las bases de Schiff formadas.

Tras dializar la solución a 4°C frente PBS 0.01 M, pH 7.2 durante 18 h se procedía a distribuir el conjugado en alícuotas convenientes, dependiendo de la potencia del mismo. Para su conservación se añadían 10 mg de seroalbúmina bovina / ml y se almacenaban a -20°C.

B.3.6. METODOS PARA EL ANALISIS DE ENTEROTOXINAS

B.3.6.a. Técnica de doble difusión en gel de agar en

-169-

Los portaobjetos se lavaron repetidas veces en una solución detergente, tras lo cual se aclararon cuidadosamente primero con agua del grifo, y posteriormente con agua destilada.

Posteriormente se pegaron dos tiras de cinta aislante, dejando entre ellas una distancia de 2 cm. Las tiras tenían una longitud de 11 cm y se comenzaron a pegar a 0.5 cm del extremo del porta, enrollándolas dos veces, estirándolo ligeramente y evitando que quedaran atrapadas burbujas de aire en su interior. Se tomaron precauciones para que el extremo final coincidiera con el inicial. Posteriormente se ejerció presión sobre la cinta aislante con un lápiz para que la adhesión fuera perfecta y no se liberara en los distintos lavados, evitando así que el agar se introdujera entre el vidrio y la cinta.

Una vez realizada esta operación, los portaobjetos se lavaron en una solución detergente, aclarándolos de nuevo primero con agua del grifo y posteriormente con agua destilada. Se depositaron entre un papel de filtro doblado, ejerciendo cierta presión para retirar el agua presente.

A continuación, se recubrieron las zonas incluidas dentro de las dos bandas de cinta aislante con agar al 0.2%. Se añadieron 3 ó 4 gotas de agar fundido y a una temperatura de 70 °C, extendiéndolas con una torunda de algodón graso. Tras breves instantes el agar se había solidificado y se procedía

Antes de que éste se solidificara, pero cuando se había alcanzado un grado de enfriamiento suficiente como para que el agar no se introdujera por los pocillos, se depositaba la plantilla de plexiglas cuidadosamente en el campo delimitado por las cintas adhesivas, comprobando que contactaba perfectamente.

Una vez enfriado se depositaban los portaobjetos en la cámara húmeda a fin de evitar al máximo la desecación del agar.

Con una pipeta capilar se tomaba un pequeño volumen de la muestra a analizar y se depositaba en dos pocillos laterales opuestos. En el central se introducía el antisuero específico y en los pocillos laterales restantes la enterotoxina patrón correspondiente. Las posibles burbujas de aire atrapadas en el extremo de los pocillos se retiraban con una aguja de vidrio fabricada con una pipeta capilar.

Una vez rellenos los pocillos se cerraba la cámara de humedad y se llevaba a incubar a 37°C durante 48 h.

Transcurrido este tiempo se retiraba cuidadosamente la plantilla de plexiglas, haciéndola resbalar sobre el agar. Se consideraba que la muestra era positiva allí donde podía visualizarse la presencia de una raya de precipitado allí donde la enterotoxina correspondía con el antisuero específico. Dicha línea se apreciaba mejor si se examinaba el

Tabla M5: Concentraciones de Enterotoxinas y diluciones de antisueros patrones utilizadas en los métodos de detección.

Enterotoxinas y antisueros	Técnica del microporta	O.S.P.
EEA	0.5 µg/ml	4 µg/ml
antiEEA	1 : 60	1 : 24
EEB	0.5 µg/ml	4 µg/ml
antiEEB	1 : 140	1 : 40
EEC ₁	0.25 µg/ml	4 µg/ml
antiEEC ₁	1 : 240	1 : 24
EED	0.25 µg/ml	2 µg/ml
antiEED	1 : 96	1 : 16
EEE	0.25 µg/ml	4 µg/ml
antiEEE	1 : 240	1 : 32

portaobjetos con luz indirecta. En aquellos casos en los cuales la lectura era dudosa se sumergían los portaobjetos en buffer fosfato salino durante breves instantes.

B.3.6.b. Método en placa de doble difusión con sensibilidad óptima. (ROBBINS et al., 1974)

Para este método se vertían 3 ml de agar Noble al 1.2% (preparado conforme a lo descrito en el apartado B.2.7.b.) en una placa de petri de 50 x 12 mm. Una vez solidificado se ajustaba la plantilla de plexiglas sobre la placa y con los sacabocados adecuados se marcaban los pocillos correspondientes. Tras levantar la placa se retiraba el agar de los pocillos con la ayuda de un asa de platino.

En todas las experiencias se depositaba el antisuero específico en el pocillo central mientras que en los dos laterales pequeños se añadía la enterotoxina patrón pertinente. En los cuatro pocillos laterales restantes se situaban dos muestras problemas diferentes enfrentadas en diagonal. Estas muestras eran bien extracto de alimento o bien sobrenadante de cultivo para determinar la producción de enterotoxina según lo descrito en el apartado B.3.3. Las concentraciones específicas para cada enterotoxina se detallan en la tabla M5.

Para su desarrollo, se cerraban las placas con su tapadera

-173-

correspondiente y se introducían en una cámara de humedad, llevándose a la estufa para su incubación a 37°C durante un mínimo de 24 h.

Transcurrido este tiempo se examinaba la presencia de una línea de precipitado entre el pocillo central y los laterales mediante luz indirecta. A fin de realzar dicha línea en los casos negativos y dudosos se vertían en la placa 2 ml de una solución 0.1M de PD_4H_3 , se retiraban éstos y se lavaba con PBS 0.01M para posteriormente añadir otros 3 ml de rojo de tiazina al 0.05%. Tras retirar esta solución se lavaba de nuevo con PBS 0.01M y se procedía a la lectura final de la placa.

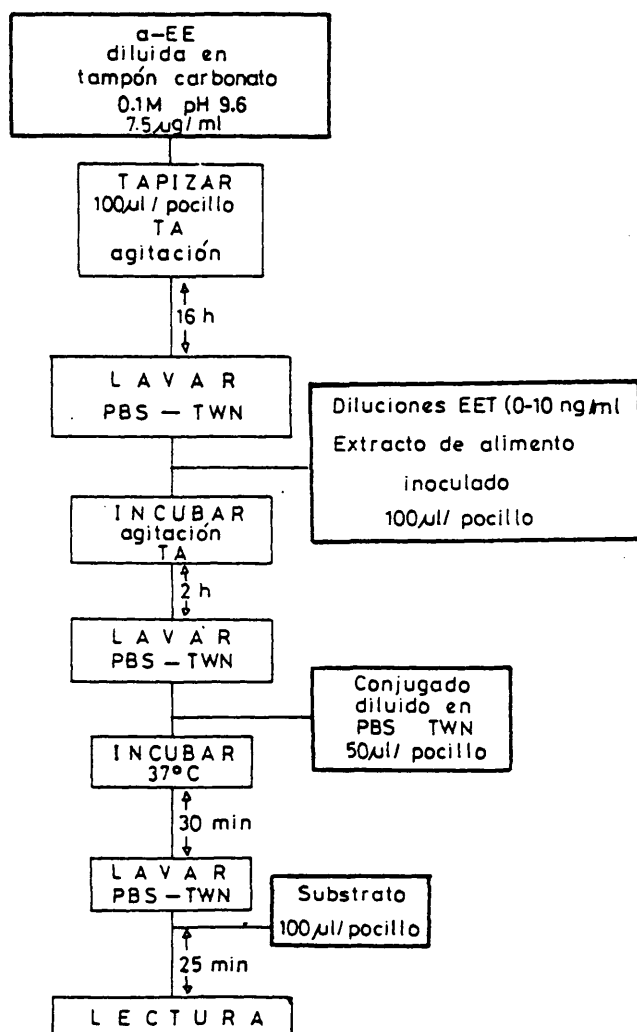
B.3.6.c. Método de enzimo inmuno análisis (ELISA)

Para la detección por mecanismos enzimáticos de las enterotoxinas se utilizó la técnica de ELISA-Sandwich DAS (FREED et al., 1982), por la que el antígeno reacciona tanto con los anticuerpos que tapizan la placa de microtitulación como con los que están conjugados con el enzima, siendo ambos obtenidos en el mismo animal.

Se diluía una solución madre de inmunoglobulinas G específicas, purificadas tal y como se describió en el apartado B.3.5.d., en tampón carbonato, 0.1M, pH 9.6 a la concentración de 7.5 $\mu\text{g/ml}$, añadiendo 100 μl en cada pocillo.

En ningún caso se tapizaban las filas denominadas A y H (extremos superior e inferior, respectivamente), pero se rellenaban con 200 µl de agua corriente, a fin de impedir la desecación. A continuación se cubrían con una lámina de parafilm y con su tapadera respectiva, facilitando un buen ajuste, que era asegurado mediante dos anillos elásticos, dispuestos perpendicularmente. Esta práctica se observaba a lo largo de los distintos pasos que exige la técnica ELISA. Se incubaba a temperatura ambiente en agitación durante 14-18 h. Al día siguiente se procedía con PBS-TWN a lavar la placa tres veces consecutivas, dejando reposar el tampón de lavado durante 5 minutos cada vez, para luego arrojarle con sacudidas enérgicas. Tras golpear repetidamente la placa contra un pliego de papel de filtro, a fin de eliminar la mayor parte del líquido, se añadía el extracto de alimento en un principio a tres concentraciones, diluyendo siempre con PBS-TWN en la propia placa. En los dos primeros pocillos la muestra no se diluía, en los dos segundos se diluía a la mitad, mientras que en los dos terceros era a un cuarto. Si en los pocillos donde la muestra estaba más diluida la absorbancia era superior a la correspondiente de 10 ng/ml en dicha placa, se preparaba otra en la que la muestra se encontrara diluida a 1:4, 1:8 y 1:16. En ningún caso fue necesario repetir una tercera placa con la muestra más diluida. En cada una de las placas se reservaban 12 pocillos para disponer igualmente por duplicado las distintas diluciones de la enterotoxina patrón. Dichas diluciones se efectuaban también en PBS-TWN y eran las siguientes: 0,

Figura M8: Diagrama de flujo de la secuencia de pasos en el método ELISA.



TA: temperatura ambiente; PBS-TWN: PBS 0.01M, pH 7.2+ Tween 20 0.1%.

0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 ng/ml. De esta forma en cada placa se situaban 10 muestras alimentarias más una escala patrón. Los volúmenes finales depositados en cada pocillo eran de 100 µl.

Una vez incubado a temperatura ambiente durante 120 minutos en agitación, se vertía el contenido y se lavaba la placa según lo descrito arriba. El conjugado se diluía en PBS-TWN, a concentraciones variables dependiendo de la potencia del mismo, pero por lo general oscilaban entre 1:200 y 1:1000, incorporando 50 µl en cada pocillo. Tras incubar durante 60 minutos, con iguales características que antes, se lavaba la placa nuevamente y se procedía a añadir la solución sustrato. Esta era añadida a razón de 100 µl/pocillo, permitiéndose que se oxidara el cromógeno en agitación sin tapar la placa. Transcurridos 25 minutos se procedía a leer la placa con el lector, a 405 nm de longitud de onda.

El cálculo de la concentración de enterotoxinas presente en la muestra se realizaba por comparación de la absorbancia de ésta con la obtenida con la enterotoxina patrón en esa misma placa. Para ello, se procedía de dos formas:

- * por un lado se representaban en un papel semilogarístico los resultados obtenidos con las diluciones de la enterotoxina patrón. para posteriormente trasladar los valores de absorbancia obtenidos con las muestras problema y hallar directamente la concentración.

- * por otro lado, se calculaba de forma teórica, con el programa incorporado en la calculadora científica Texas Instruments TI-51-III, mediante el cual, tras introducir los valores de la absorbancia para cada dilución de la enterotoxina patrón, se podía hallar el coeficiente de correlación, la pendiente de la recta y la intercepción en el eje de las ordenadas, así como la concentración de enterotoxina para cualquier valor de absorbancia.

B.3.7. METODO DE DETECCION DE NUCLEASAS

En el agar azul de toluidina, preparado conforme lo descrito en el apartado B.2.8., se depositaban 60 µl bien del extracto del alimento preparado para la detección de enterotoxinas por la técnica ELISA, o bien del alimento íntegro en los casos de mayonesa y leche condensada, o de la muestra de queso diluida 1:3 en agua de peptona 1% + Tween 20 (B.3.2.c.).

Para la detección de la deoxirribonucleasa termoestable (TNasa) se calentaban 2 ml de alimento en tubos Eppendorf a vapor fluente en el autoclave durante 15 minutos, transcurridos los cuales se enfriaban rápidamente. A continuación se procedía de la forma indicada más arriba.

Las placas se incubaban a 37°C durante 4 h, transcurridas las cuales se medía el diámetro del halo con una regla.

B.3.8. METODOS ESTADISTICOS

El procedimiento estadístico al que se recurrió con mayor frecuencia fue el análisis de varianza por diferencia entre medias ("comparación de dos medias"). Esta responde a la fórmula

$$t = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

siendo m_1 y m_2 la media del conjunto de muestras de cada tipo a comparar, respectivamente, σ la desviación típica, y n el número de muestras examinadas. Cuando este índice es superior o igual a dos, la diferencia entre las muestras tiene significado estadístico en el intervalo de confianza del 95%, mientras que si es superior a 2.6, los límites de seguridad son del 99%.

También se estudió el coeficiente de correlación, para analizar la dispersión de la muestra. Dicho coeficiente se calculaba de forma directa mediante una calculadora programable Texas Instruments, modelo TI-51-III, con la que una vez introducidos los datos, además de los valores de media, desviación standard y varianza, también se hallaba la

~~-179-~~

pendiente de la curva y la intercepción en el eje de las ordenadas, así como los valores teóricos de "x" para una medición "y".

C. INTERES Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Las intoxicaciones por enterotoxinas estafilocócicas son un tema del máximo interés dentro del cada día más importante capítulo de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Las infecciones e intoxicaciones humanas originadas por el consumo de alimentos han venido incrementando su frecuencia de una forma paradójica, puesto que el hecho coincide con un mejoramiento del nivel de vida y de las circunstancias higiénico sanitarias de las poblaciones.

Las modificaciones de los hábitos culinarios en aras de una evolución social que exige economizar tiempo en los quehaceres domésticos conlleva unas modalidades nuevas de alimentarse. El uso creciente de diferentes tipos de semiconservas, de alimentos pasterizados, de platos precocinados significa, sin duda, una evidente ventaja en el momento actual, pero manifiesta también una serie de peligros ante cualquier deficiencia en la producción, manejo y conservación de estos alimentos.

De igual forma, el carácter de ubicuidad de los estafilococos, estando presentes en un alto porcentaje de individuos (incluidos los manipuladores de los alimentos), en los que pueden hallarse de forma saprofita o en heridas que no revisten importancia, incrementa el peligro de

intoxicaciones de origen estafilocócico.

El objetivo del presente trabajo ha sido el de estudiar bajo qué condiciones se desarrollaban los estafilococos y se secretaban las enterotoxinas en tres alimentos diferentes, dos de origen lácteo (queso de tipo manchego y leche condensada) y uno considerado una salsa de mesa (mayonesa). De entre la amplia gama de alimentos que el mercado ofrece al consumidor han sido elegidos en base a 1) ser de gran consumo en nuestro país, y 2) considerarse prototipo de alimentos almacenables durante periodos de tiempo más o menos largos por estar la flora microbiana reprimida por tres factores inhibitorios del crecimiento:

- a) flora competidora: queso de tipo manchego,
- b) valor de pH: mayonesa, y
- c) actividad de agua: leche condensada

El queso manchego es indudablemente el de mayor consumo en España. Esta popularidad de la que goza se basa en el extenso área de origen del mismo, abarcando en un principio las provincias que constituyen la Mancha: Toledo, Cuenca, Albacete y Ciudad Real, pero ocupando hoy en día una zona de elaboración mucho más amplia. Por lo tanto, tradicionalmente se ha venido consumiendo en gran parte de nuestro país, por la posibilidad de aprovechamiento de un excedente de leche.

Actualmente, y gracias a las campañas publicitarias por parte de las empresas que contribuyen así a regular el excedente de

leche procedente de la especie ovina, así como del concienciamiento del consumidor de las importantes cualidades nutritivas de este alimento su consumo promete experimentar un alza en el mercado interior, e incluso, merced a la protección que le ofrece la reciente divulgación de la ley de "denominación de origen" (B.O.E. 5 de enero, 1985) pasar a ser un producto de exportación.

Las propiedades de conservación del queso se basan en la adición intencionada en la industria de una flora láctica competidora que inhibe el crecimiento ulterior de los microorganismos patógenos por una serie de factores, tales como la reducción del pH, la producción de ácido láctico, la competición por nutrientes esenciales, etc. Es bien sabido que los estafilococos son unos competidores débiles, por lo que quedarían afectados.

Para disminuir la concentración de microorganismos presentes en la leche es práctica acostumbrada el pasteurizar, pero esto conlleva un riesgo importante, ya que podría recontaminarse con estafilococos, que, libres de inhibición competidora y gracias a un tiempo rápido de generación, podrían adquirir niveles importantes antes de la adición del cultivo láctico.

Tampoco es infrecuente el fallo del cultivo iniciador principalmente por tres causas: a) presencia de cantidades traza de sustancias antibióticas en la leche; b) contaminación por bacteriófagos; y c) contaminación del

cultivo con estafilococos.

Un caso extremo lo representa la utilización de leche procedente de ovejas aquejadas de mamitis subclínicas. Se ha descrito (AHMED et al., 1983a) que los estafilococos presentes naturalmente en la leche son mucho más resistentes que los añadidos artificialmente tras la pasteurización. Por lo tanto, cuando ésta es insuficiente también podrían representar un problema potencial.

Estas tres circunstancias influirían en el desarrollo posterior de los estafilococos en el queso, donde, merced a la riqueza nutritiva del mismo, y al largo periodo de maduración, podrían crecer en número suficiente para secretar enterotoxinas en niveles en los que se podría considerar el alimento como un producto de riesgo.

El consumo incrementado de la mayonesa obedece principalmente a su fácil elaboración casera, mediante aparatos que permiten preparar esta salsa de mesa en cuestión de minutos, pero también a las cualidades de conservación que posee.

La represión sobre la flora microbiana se debe al pH ácido de la mayonesa, por la adición bien de vinagre o bien de zumo de limón. Este pH es suficiente para inhibir el desarrollo de la mayoría de las bacterias, pero se ha indicado que los estafilococos pueden desarrollarse incluso en valores de pH

de 4.0 (GENIGEORGIS et al., 1971a), y, de hecho, la mayonesa es el alimento que mayor número de veces se ha implicado en intoxicaciones estafilocócicas, como se cita en las distintas ediciones del Boletín Epidemiológico Semanal, de lo que se deduce que este factor no es suficiente para reprimir la microflora estafilocócica.

Las posibilidades de presencia de enterotoxinas en los alimentos acompañados de esta salsa de mesa son múltiples. Por una parte, ciertos establecimientos como bares y cafeterías exponen bajo un mostrador de vidrio, que en ocasiones alcanza temperaturas elevadas, sus productos durante el tiempo suficiente para que se secreten enterotoxinas. En otras ocasiones es el largo periodo de tiempo que ha de permanecer a temperatura ambiente la fiambarrera que transporta la ensaladilla de escolares y trabajadores lo que favorece que el consumo de ese alimento implique un riesgo.

Los datos señalan que la mayor frecuencia de brotes mayoritarios se producen en los comedores escolares y en los banquetes con asistencia multitudinaria. En ambos casos, la necesidad de preparar comida para un elevado número de personas exige que diste cierto periodo de tiempo entre el comienzo de los preparativos y el consumo, tiempo en el que el alimento permanece a temperatura ambiente.

La leche condensada también ha disfrutado de un consumo masivo en nuestro país, en base, en las esferas domésticas a la comodidad que representaba el almacenamiento de leche bajo esta forma, y al gran consumidor que tenía entre la población infantil, y en las industriales por el aprovechamiento del excedente de leche, haciéndolo llegar a aquellos lugares de la geografía española que carecían de una ganadería suficiente para abastecer a los ciudadanos. Actualmente, su consumo parece haber disminuido a nivel familiar, por la concienciación ciudadana de los efectos perjudiciales que conlleva el consumo de niveles elevados de azúcar. Sin embargo, la industria de la repostería encuentra en la leche condensada un importante ingrediente en gran número de recetas.

En este alimento la actividad inhibitoria está basada en la baja actividad de agua que posee. No obstante, los estafilococos se incluyen dentro de los microorganismos patógenos que sobreviven a condiciones más bajas de actividad de agua. De hecho, tanto el crecimiento de estas bacterias como la síntesis de EEA se pueden dar en valores de actividad de agua de 0.86 (LOTTER y LEISTNER, 1976). Esto, además de que el almacenamiento se efectúa en locales que en el sur de España pueden alcanzar en verano una temperatura entre 30 y 40 °C, conduce a que en caso de persistir unidades formadoras de colonias de estafilococos en los botes de leche condensada, éstos puedan multiplicarse y alcanzar niveles suficientes como para que la presencia de enterotoxinas

represente un riesgo potencial.

De igual forma, los modernos sistemas de producción industrial de leche condensada, consistentes en la adición del azúcar a la leche mantenida en el tanque de espera, para ser posteriormente sometida al tratamiento térmico de concentración, permite que la flora patógena osmotolerante de la leche se desarrolle, permitiéndose, en el caso concreto de los estafilococos enterotoxigénicos que secreten sus toxinas. La temperatura de 120° C a la que se somete la leche para evitar que se caramelize destruye la microflora presente pero, en virtud de la termorresistencia de las enterotoxinas, éstas podrían permanecer en el producto elaborado.

En resumen, la finalidad del presente estudio reside en la determinación de bajo qué circunstancias (inóculo, temperatura, tiempo de incubación, concentración del cultivo iniciador) se multiplican los estafilococos y secretan enterotoxinas en tres alimentos, conceptuados generalmente como inhibitorios para los microorganismos patógenos por sus condiciones de competición microbiana, pH o actividad de agua.

CAPITULO II:

Q U E S O T I P O M A N C H E G O

A. INTRODUCCION

- A.1. QUESO MANCHEGO
- A.2. BROTES EN LOS QUE SE HAN INCULPADO QUESOS DE DISTINTO TIPO
- A.3. ORIGEN DE LA CONTAMINACION
- A.4. FACTORES QUE CONTROLAN EL CRECIMIENTO ESTAFILOCOCCICO EN QUESOS
 - A.4.1. CULTIVO INICIADOR
 - A.4.2. VALOR pH
 - A.4.3. ACTIVIDAD DE AGUA
 - A.4.4. CLORURO SODICO
 - A.4.5. OTROS
- A.5. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES TECNOLOGICAS
- A.6. EVOLUCION DE LOS ESTAFILOCOCCOS EN LA MADURACION

A.1. QUESO MANCHEGO

El Código Alimentario Español define el queso como el producto fresco o maduro obtenido por separación del suero, después de la coagulación de la leche natural, de la desnatada total o parcialmente, nata, suero de mantequilla o de sus mezclas.

En concreto, el queso manchego es de tipo afinado, madurado o fermentado, por haber sufrido otras fermentaciones y transformaciones en su masa.

Es un alimento muy nutritivo de gran consumo en nuestro país, donde existe una gran diversidad de tipos (cervera, torta del casar, cabrales, mahón, pasiego, tetilla, valdeteja, camerano, palmero,...). Indudablemente, el que mayor difusión tiene es el denominado manchego, elaborado en un principio en la región de la Mancha (Toledo, Cuenca, Albacete, Ciudad Real) pero que en la actualidad ocupa una demarcación mucho más amplia, al haberse difundido su elaboración por casi toda la península. Los datos del Ministerio de Agricultura (1973) señalan que cada año se elaboran 2.500 toneladas.

Para la elaboración del queso de tipo manchego se utiliza leche de oveja cuando es artesanal, o leche de mezcla de las especies ovina, caprina y bovina, cuando se produce de forma industrial. Recientemente, se ha promulgado la ley de "Denominación de Origen: Queso Manchego", que indica que solo puede ser denominado queso manchego aquel elaborado con leche de oveja. A esa leche se le adiciona cuajo animal, cloruro sódico, fermentos lácticos y cloruro cálcico.

Las características esenciales del queso listo para el consumo son las que a continuación se detallan (MINISTERIO DE AGRICULTURA, 1973)

- Tipo: pasta prensada y dura

- Forma: cilíndrica
- Dimensiones: de 18-22 cm de diámetro, por 8-9 cm de altura.
- Peso: 2.5-3.0 kg
- Corteza: dura, con impresiones de los moldes o pleitas en la superficie lateral y de la "flor" en las caras planas. Es de color amarillo paja pálido, una vez limpia la superficie de los mohos verdosos negruzcos crecidos durante la maduración, aunque en ciertos sectores del mercado se prefiere con mohos.
- pasta: firme, de color blanco marfil a blanco amarillento, aroma y sabor característicos.
- ojos: en pequeño número, desiguales y repartidos por toda la masa, o bien sin ojos.

A.2. BROTES EN LOS QUE DISTINTOS QUESOS HAN SIDO INCULPADOS COMO CAUSANTES DE INTOXICACION ESTAFILOCOCCICA

Desde la publicación de FABIAN (1947) se han dado a conocer varios brotes de intoxicación en los que la enterotoxina estafilocócica se vehiculó en el queso. La mayoría proceden de EE.UU. donde tuvieron lugar varios episodios durante el periodo transcurrido entre 1944 y 1952 (HENDRICKS et al., 1959). Con posterioridad, se describieron otros dos brotes, en 1955 y en 1958, en los que el alimento implicado fue queso de tipo Cheddar, y en 1960 (ALLEN y STOVALL, 1960) se registró otro brote, esta vez por queso tipo Colby. Hay que

hacer mención que los quesos de tipo tanto Cheddar como Colby recuerdan en su metodología a la del manchego.

Al comienzo de la década de los 60 tuvo lugar en un hospital de Inglaterra un brote de intoxicación de etiología estafilocócica, en el que el alimento implicado fue queso de tipo Cheddar. En 1968, ZEHREN y ZEHREN publicaron los resultados de los análisis de quesos de tipo Cheddar, Monterey y Kuminost que habían producido brotes dispersos. Todos ellos fueron elaborados en una industria quesera en Missouri, observándose que correspondían a lotes en los que el cultivo iniciador había presentado una actividad infranormal. Dado que los quesos fueron fosfatasa negativos se sugirió una contaminación tras la pasteurización.

MULLER (1974) pudo detectar enterotoxina estafilocócica en 22 quesos de 30 que habían desencadenado sintomatología de gastroenteritis. MOL y VINCENTIE (1975) indicaron que en uno de dos quesos sospechosos de producir intoxicación se había podido demostrar la presencia de enterotoxina. Por otra parte, en un estudio sobre productos lácteos GOSH y LAXMINARAYANA (1973) encontraron que de 20 muestras de queso Cheddar, dos contenían enterotoxina estafilocócica.

En Quebec (Canadá) se informó de un brote de intoxicación en 1980 (FRI. ANNUAL REPORT, 1982) por el consumo de cuajada, identificándose un total de 62 casos. Los recuentos de *Staphylococcus* oscilaron entre 2 y 8×10^7 /g en las cuajadas y de

5×10^2 a 1.5×10^7 /g en las heces de los pacientes, siendo la concentración de enterotoxinas A ó C presente en las muestras de 0.27 a 0.88 $\mu\text{g}/100$ g de muestra. Un hecho a señalar de este brote fue la pequeña cantidad de enterotoxina requerida en apariencia para provocar el síndrome, determinándose que tan sólo 0.016 ng habían sido suficientes.

En España, los brotes que ha registrado el Ministerio de Sanidad, publicándolos en el Boletín Epidemiológico Semanal, hacen referencia principalmente a quesos blandos. En 1979, SUAREZ (1979) detectó EEA en quesos frescos de cabra que habían provocado un brote en la provincia de Valladolid. En 1980 se registraron dos brotes igualmente por la ingestión de queso fresco, uno en Avila y otro en Badajoz, ambos con 26 afectados cada uno. El año siguiente, en Tenerife se afectaron 14 personas por la ingestión de queso fresco de preparación familiar. En esta provincia, los brotes por intoxicación de esta naturaleza parecen tener cierta frecuencia, ya que en 1982 hubo otro brote, y en 1984 tres brotes, implicando a 2, 3 y 36 personas cada uno (Boletín Epidemiológico Semanal, 1980, 1981, 1982, 1983, 1984).

A.3. ORIGEN DE LA CONTAMINACION

El hecho de que se sigan registrando brotes de este origen indica que los quesos contaminados son responsables, al menos de forma ocasional, de casos de intoxicación estafilocócica,

pudiéndose además demostrar de forma experimental en los mismos la presencia de enterotoxina si el cultivo "starter" tiene una actividad inferior a la normal.

Dada la contaminación frecuente por estafilococos a partir del personal trabajando en la industria de la leche y derivados lácteos y la elevada incidencia de mamitis de etiología estafilocócica en la especie bovina, probablemente la intoxicación transmitida por quesos con un porcentaje mayor de incidencia sea la estafilocócica. Aunque la pasteurización es una práctica común en la industria quesera no es bajo ningún concepto universal, existiendo además la posibilidad de una contaminación tras dicho tratamiento térmico bien por aerosoles originados en el bombeo y goteo de la leche cruda, o bien por el personal adscrito a la industria.

La presencia de estafilococos coagulasa positivo en leche y derivados lácteos ha sido puesta de manifiesto por numerosos autores (THATCHER et al., 1959; DONNELLY et al., 1961, 1964, 1967; IBRAHIM y RADFORD, 1979). La fuente suele estar representada por las vacas mamíticas. Si la leche no se pasteuriza, los microorganismos se continúan multiplicando en el silo de la leche (TAKAHASHI y JONES, 1959; THATCHER y ROSS, 1960; JEZESKI et al., 1961; McLEOD et al., 1962; TATINI et al., 1970). La comisión International Dairy Federation (1980) señala que dependiendo de las prácticas de producción y de higiene de las granjas, así como de las temperaturas de

almacenamiento, el recuento de bacterias totales en la leche cruda varía entre unos pocos miles hasta 1×10^5 /ml en las leches de grado A. Estas pueden tener desde algunas células de *Staphylococcus aureus* a 10-3300/ml, mientras que las que se utilizan para procesamiento de derivados lácteos pueden contener más de 1×10^4 /ml. En España, SUÁREZ (1966) emprendió un estudio muy completo a fin de determinar la carga estafilocócica en leche natural de bovino. Sus resultados indican que hay variaciones estacionales tanto en la concentración de microorganismos totales como en la de estafilococos. Las cifras medias que apuntó fueron de 1.8×10^6 microorganismos/ml y 85×10^3 estafilococos/ml. Por lo tanto, en España se ha observado, en primer lugar una contaminación global más elevada, y en segundo lugar, el porcentaje respectivo de estafilococos fue superior al indicado por la FIL-IDF en aproximadamente un 42%. Sin embargo, con una tecnología de muestreo diferente (realizado en comarcas donde la temperatura ambiental media era más alta a la del estudio anterior, y abarcando una zona más amplia, por lo que transcurría mayor periodo de tiempo desde el ordeño hasta el estudio) VADILLO (1983) señala que el recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales ascendió por término medio a 70×10^6 /ml; por lo tanto la cifra de estafilococos que cabría esperar en teoría correspondería a 700 veces más estafilococos, con el problema agravado de que también se debe incluir la leche de un gran número de vacas con mastitis subclínicas. A este respecto DELARRAS y LABAN (1981) publicaron unos datos según los

cuales, la prevalencia de *S. aureus* era escasa en la leche (4/46 estafilococos), y prácticamente inexistente en el queso (1/25). En queso, la especie que se aisló con mayor frecuencia fue *S. xylosum*.

La mayor incidencia de mastitis estafilocócica en las ganaderías de leche, en este periodo de empleo masivo de los antibióticos, ha favorecido la presencia de estafilococos patógenos en queso. Un estudio reciente en el Reino Unido (FIL-IDF, 1980) indica que aproximadamente el 50% de las mastitis infecciosas sean de etiología estafilocócica.

La introducción frecuente de estafilococos en las queserías a través de la leche natural probablemente conduzca a una elevada incidencia de contaminación ambiental. PAL et al. (1970) manifestaron que la leche procedente de todas las granjas estudiadas asociadas a una central quesera contenía estafilococos, en niveles que oscilaban en comienzo de 50 a 7000/ml, que tras 90 minutos de incubación a 30°C incrementaban casi un ciclo logarítmico, al igual que tras tres horas a 25°C. En el Reino Unido, el número de estafilococos en leche oscilaba entre <10/ml hasta 6000/ml con recuentos esporádicos de 10^5 /ml.

Una vez pasteurizada la leche también existe la posibilidad de una contaminación cruzada accediendo los estafilococos a ella por el aire y a través del material e instalaciones, así como por el personal laboral. Se ha

indicado un elevado índice de individuos que portan estafilococos en sus cavidades nasales (ver A.6. en el capítulo I).

A.4. FACTORES QUE CONTROLAN EL CRECIMIENTO DE ESTAFILOCOCOS EN LOS QUESOS

A.4.1. Cultivo iniciador

Se han realizado muchas observaciones que demuestran que los cultivos lácticos utilizados en quesería pueden proteger de forma efectiva los productos fermentados frente al crecimiento de los microorganismos patógenos, y en este caso concreto, frente a estafilococos (IANDOLO et al., 1965; DiGIACINTO y FRAZIER, 1966; KAO y FRAZIER, 1966; MCCOY y FABER, 1966; TATINI et al., 1970; HAINES y HARMON, 1973). Por el contrario, en caso de fracaso del cultivo "starter" no se inhibirá el crecimiento de bacterias patógenas. Algunas de ellas son las que se ofrecen a continuación:

Cultivos iniciadores mesófilos: Los estreptococos utilizados como "starter" inhiben el desarrollo de *Staphylococcus aureus* por diversos factores además de la producción de ácido láctico (REITER et al., 1964). IBRAHIM (1978) cifra las posibilidades inhibitorias del cultivo de arranque en el efecto

del ácido láctico, del peróxido de hidrógeno producido por los estreptococos lácticos, del sistema lactoperoxidasa, de la competición por los nutrientes, y de las sustancias dializables. No obstante, y debido a las contradicciones apreciadas en la bibliografía no es por una sola característica por la que se produce la inhibición. Por lo tanto, las bacterias ácido lácticas que se desarrollan en la leche son capaces de inhibir la flora patógena mediante la producción de una serie de factores diferentes que actúan de forma probablemente sinérgica. Un cultivo "starter" vigoroso debería así proteger los derivados lácteos fermentados frente al crecimiento de microorganismos patógenos y de la formación de enterotoxinas estafilocócicas.

Una de las potencialidades que se han estudiado de manera más exhaustiva ha sido la de producción de H₂O₂ en la leche (DAHIYA y SPECK, 1968; GILLILAND y SPECK, 1969; PRICE y LEE, 1970). En caldo, los estreptococos y otras bacterias productoras de ácido láctico que crecen en asociación con los estafilococos redujeron éstos en 4 ciclos logarítmicos por mililitro, evitando la producción de enterotoxina. Se sugirió que el origen de esta inhibición radicaba en la producción de H₂O₂ y de competición por los nutrientes (HAINES y HARMON,

1973). GILLILAND y SPECK (1974) demostraron que el antagonismo de *Streptococcus lactis* y *S. aureus* en crecimiento asociado en la leche no era debido a la liberación de H_2O_2 (ya que la adición de catalasa no ejercía ningún efecto sobre los estafilococos). Sin embargo, IBRAHIM (1978) comprobó que con otras estirpes estreptocócicas la adición de catalasa, aun en concentraciones mínimas, suponía una reducción de la inhibición sobre *S. aureus*, debido al metabolismo de H_2O_2 . Así mismo, aquellos estreptococos con actividad H_2O_2 baja apenas repercutían sobre los estafilococos, pero los que mostraban una actividad H_2O_2 elevada provocaban una inhibición significativa de *S. aureus*, incluso con las concentraciones más elevadas de catalasa.

Los valores bajos de pH (4.0-4.5) y el ácido láctico presentan carácter inhibitorio (REITER et al., 1964; MINOR y MARTH, 1970; GILLILAND y SPECK, 1972; TODD et al., 1981), aunque tampoco se puede imputar exclusivamente la acidez como causa de esta inhibición, ya que cuando se controló el pH de la leche, ajustándolo a un valor de 6.6 no cesó la presión ejercida sobre los estafilococos. Así mismo no se pudo hallar una relación unívoca entre la intensidad del antagonismo y la cantidad de ácido láctico producido por diferentes cepas (GILLILAND y

SPECK, 1972).

La competición por nutrientes esenciales (biotina y niacina) fue analizada por IANDOLD et al. (1965), por HAINES y HARMON (1973) y por NISKANEN y NURMI (1976). IBRAHIM (1978) opina que este factor parece ser despreciable en la leche y sus derivados.

NISKANEN y NURMI (1976) suponen que otro de los factores a tener en cuenta por sus posibilidades de actuar en la inhibición de los estafilococos es la producción de sustancias con propiedades antibióticas (nisina). Esto ya fue puesto de manifiesto por TROLLER y FRAZIER (1973) y posteriormente analizado por TODD et al. (1981).

Las condiciones que pueden motivar el fallo del cultivo de arranque fueron enumeradas por IBRAHIM et al. (1981) y las cifraron en la presencia de residuos antibióticos en la leche frente a los que pueden ser sensibles la flora láctica, la contaminación de la leche por cepas de Staphylococcus aureus resistentes a antibióticos, y la contaminación de la cepa "starter" por un bacteriófago (TATINI et al., 1971).

Cultivos "starter" termófilos Los filtrados de cultivos

de *L.helveticus*, *L.bulgaricus* y *L.lactis* utilizados en la elaboración de determinados tipos de quesos son también inhibitorios para *S.aureus* por la producción de H_2O_2 , así como por fomentar un medio ácido (pH 3.8-4.5) (DAHIYA y SPECK, 1968).

A.4.2. Valor pH

Los niveles inhibitorios de pH se alcanzan generalmente por el ácido láctico producido por el metabolismo de la lactosa. IBRAHIM (1978) indica que un pH de 5.27 ó inferior sería ya suficiente para impedir el crecimiento abundante de los estafilococos.

A.4.3. Actividad de agua

La actividad de agua se ha recomendado intensamente como un parámetro para controlar el crecimiento microbiano en los alimentos de humedad intermedia. (TROLLER y CHRISTIAN, 1978), siendo excepcional *S.aureus* en cuanto a su capacidad de sobrevivir, crecer y elaborar toxinas en ambientes con aw baja.

A.4.4. Cloruro sódico

La sal es un componente funcional necesario en queso y en algunos otros productos fermentados. Además de influir sobre el sabor, la textura y el contenido en humedad, la concentración de sal regula la fermentación, inhibe la contaminación por microorganismos indeseados, y favorece un microambiente útil para los microorganismos deseados (KDENIG y MARTH, 1982). Sin embargo, los estafilococos son microorganismos cuya tolerancia al cloruro sódico ha sido puesta de manifiesto en múltiples ocasiones, por lo tanto este parámetro, lejos de evitar el desarrollo de los mismos, favorece su establecimiento en los quesos. A este respecto, AHMED et al. (1983a) informaron que el crecimiento estafilocócico es mucho más evidente en quesos salados que en aquéllos carentes de este ingrediente. KDENIG y MARTH (1982) concluyeron que el ClNa podía ser en parte sustituido por ClK , más agresivo para los estafilococos, permaneciendo las características organolépticas inalteradas.

A.4.5. Otros

METCALF y DEIBEL (1969) recomiendan la adición de lisostafina a la materia prima a emplear en la elaboración de queso, ya que la flora estafilocócica se ve sensiblemente disminuida, permaneciendo el producto en la cuajada. Sus resultados no fueron concluyentes, puesto que fue incapaz de evitar que se desarrollara una población elevada de *Staphylococcus* tras 3 ó 4 semanas de afinado.

A.5. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES TECNOLÓGICAS DE ELABORACIÓN DEL QUESO EN EL DESARROLLO DE LOS ESTAFILOCOCOS Y EN LA PRODUCCIÓN DE ENTEROTOXINAS

Queso Cheddar

Los estafilococos se multiplican a mayor velocidad en el queso Cheddar de baja acidez, donde el "starter" produce una cantidad insuficiente de ácido por la presencia de un fago, por antibióticos o por el uso de cepas que producen ácido en bajas concentraciones de forma prolongada. La completa inhibición del cultivo iniciador por un fago ofreció como resultado un pH en la rotura de la cuajada de 6.6 en vez de 4.95, con la consiguiente multiplicación de *Staphylococcus aureus*, siendo el recuento de éstos de 5 a 10 veces superior que en los quesos controles (REITER et al., 1964). Cuando se utilizó leche natural, los estafilococos naturales (10^3 /ml de leche) se multiplicaron menos que cuando la leche fue pasteurizada. En las queserías industriales, cuando la leche pasteurizada se recontaminó de forma masiva por estafilococos, éstos sólo fueron capaces de alcanzar cotas peligrosas cuando los lotes presentaban poca acidez (<0.4%), pero no en aquéllos con un grado normal de la misma (ZEHREN y ZEHREN, 1962). Sin embargo, los investigadores americanos (JEZESKI et al., 1961; TUCKER et al., 1964) hallaron que en condiciones normales sólo se desarrollaban dos o tres generaciones tras mantener 18 h la cuajada, aunque se utilizara leche pasteurizada inoculada con estafilococos. Otros (TATINI et al., 1971b) encontraron ritmos de multiplicación de los estafilococos muy

variables dependiendo de los "starter" utilizados y de los inóculos iniciales de estafilococos. Con una acidez normal se tenían que desarrollar al menos 28×10^6 estafilococos /g de queso para poder detectar enterotoxina, mientras que con la falta completa de actividad del cultivo iniciador (inducida por un fago) el desarrollo de las células estafilocócicas fue más notorio y la enterotoxina se pudo detectar cuando el recuento de estafilococos fue de tan sólo $3 - 5 \times 10^6$ /g .

Queso suizo y Emmental (WEBER, 1968)

La presencia de enterotoxina producida por una cepa fue evidente cuando se alcanzó la cifra de recuento de 7×10^6 estafilococos/ml. Los estudios realizados indican que Staphylococcus aureus desaparece en el curso de las primeras 24 h.

Queso azul

TATINI et al. (1973) indicaron que no pudieron detectar la presencia de enterotoxina en este tipo de queso cuando la acidez era normal aunque los estafilococos se habían multiplicado a una velocidad similar a la del queso suizo (4 a 5 generaciones presentes en la cuajada), incluso en el caso de que el cultivo "starter" fallara y con cifras de recuento de 5×10^7 /ml. Se sugirió que el microambiente de este tipo de queso era disgenésico para la producción de enterotoxina.

Queso tipo Gouda (STADHOUDERS, 1976)

Se observó multiplicación de estafilococos naturales de la leche natural en condiciones óptimas de acidificación durante el proceso de elaboración de los quesos de tipo Gouda. El ritmo de destrucción de los estafilococos durante la maduración del queso parecía estar influido por los distintos cultivos lácticos utilizados (todos ellos cepas mesófilas). Con algunos "starter" se determinó un crecimiento más rápido que con los otros. Tras seis semanas el nivel había disminuido hasta alrededor de la décima parte de la presente en la cuajada, mientras que con otros cultivos lácticos las cifras decrecieron sólo a la mitad.

Al utilizar leche pasteurizada en la que se habían inoculado distintas cepas se observó que la producción de enterotoxina sólo adquiría valores detectables cuando las células de *Staphylococcus aureus* alcanzaban 2×10^8 /g de queso.

Queso tipo Derve (WAES, 1977)

Se emplearon para la elaboración de estos quesos leche natural de calidad bacteriológica tanto pobre ($2-10 \times 10^6$ células viables/ml) como buena ($8-10 \times 10^3$ células viables/ml), con estafilococos oscilando entre 30 y 900/ml de leche. En el prensado, los quesos preparados con leches de recuentos elevados presentaron un valor de pH de 5.78-6.03, con un recuento de estafilococos de $3-100 \times 10^2$ /g, mientras que aquéllos preparados con leche de buena calidad las cifras

correspondientes fueron 6.6 y 3.6×10^5 /g, respectivamente.

Queso mozzarella

TATINI et al. (1973) evaluaron las condiciones potenciales de producción de enterotoxina durante las diversas fases de la elaboración de queso mozzarella, siendo incapaces de detectar dicha sustancia a pesar de elevarse la cifra de recuento a 20×10^6 células/g tras las primeras horas de elaboración. Sin embargo, MONTANARO et al. (1978) evidenciaron la presencia de enterotoxinas estafilocócicas A y B tras 48 h de almacenamiento con un inóculo inicial de 10^7 *S. aureus* /g, indicando que los recuentos estafilocócicos necesarios para producir niveles detectables de enterotoxina fueron de 28×10^7 células/g (EEA) y 9×10^7 células/g (EEB), siempre relacionado con la ausencia total o parcial de cultivo iniciador.

A.6. EVOLUCION DE LOS ESTAFILOCOCCOS DURANTE EL PERIODO DE MADURACION DE LOS QUESOS

Se ha observado que los recuentos de estafilococos decrecen continuamente a lo largo del periodo de maduración de los quesos, pero en aquéllos en los que la actividad del "starter" es infranormal, los estafilococos continúan multiplicándose durante las primeras semanas de maduración (REITER et al., 1964).

En queso Cheddar elaborado con leche sometida a un tratamiento térmico inoculada con estafilococos (REITER et al., 1964) y en la que la actividad del "starter" era normal los estafilococos disminuyeron 100 veces en 16 semanas, pero hubieron de transcurrir 24 semanas para que se apreciara una reducción similar en leches contaminadas de forma natural. En quesos con acidez baja no se constató cambio alguno en las cifras de recuento tras 18 meses, habiendo sido sometidos los quesos a 10° C durante la maduración. TUCKEY et al. (1964) demostraron que la disminución en número de los estafilococos en quesos Cheddar y Colby era más acusada cuando la maduración se producía a 10 y 13° C que a 7° C.

Según lo expuesto, el desarrollo de los estafilococos depende principalmente del tipo de queso y del tipo de "starter" utilizado. La no detección de estafilococos en los quesos implicados en brotes de intoxicación no puede garantizar la ausencia de enterotoxina. Por otra parte, la presencia de estafilococos coagulasa positivos no significa que haya enterotoxina.

THATCHER et al. (1959) demostraron que existía enterotoxina en 8 de 149 quesos de 30 a 60 días. Si los estafilococos han crecido hasta niveles superior o igual a 10^6 /g en cualquier momento durante la elaboración o durante la maduración ha existido la posibilidad de producirse enterotoxina, pudiendo

-207-

permanecer durante muchos meses según el queso madura,
incluso con valores bajos de pH.

B. RESULTADOS

- B.1. ETAPA DE FABRICACION DEL QUESO
- B.2. VARIACIONES EN EL pH EN EL PROCESO DE FABRICACION
- B.3. VARIACIONES EXPERIMENTADAS EN LOS QUESOS CON pH MODIFICADO
- B.4. VALORES DE DN₅₀ Y TN₅₀ OBTENIDOS
- B.5. EVOLUCION DE LOS MICROORGANISMOS A LO LARGO DEL PERIODO DE MADURACION
 - B.5.1. SALADO EN SALMUERA
 - B.5.2. PERIODO DE MADURACION
- B.6. SINTESIS DE ENTEROTOXINAS A LO LARGO DEL PERIODO DE MADURACION

Para mayor comodidad en la referencia de los quesos se denominarán por el número de la cepa, seguido de la concentración del cultivo "starter" y en su caso, por (G) o (P), dependiendo de que el molde utilizado en su fabricación fuera grande o pequeño.

Aquellos quesos denominados C son los controles o testigo, en los cuales no se añadió estafilococos. Los quesos que ostentan la denominación de P y tal y como se mencionó en el apartado oportuno, corresponden a aquéllos en los que el suero tras cuajarse la leche fue sustituido por un tampón

fosfato de elevado pH, procediendo a introducir la pasta en el molde tras 1 h en esta situación. Los quesos encabezados por E corresponden a aquéllos en los que se adicionó enterotoxina de tipo A y B en lugar de estafilococos (al igual que éstos, antes de añadir ningún compuesto químico o biológico a la leche).

B.1. ETAPA DE FABRICACION DEL QUESO (Tabla RQ1)

Las variaciones observadas en cuanto a recuento de microorganismos, pH y desoxirribonucleasa termoestable se expresan en las tablas RQ1, RQ4 y RQ5.

En la tabla RQ1 se indican los microorganismos registrados en cada una de las fases: leche antes de inocular, tras la adición de estafilococos (contaminación real), al adicionar el cultivo "starter" bien en la proporción 1 ó 0.1%, tras agregar cuajo, una vez coagulada la leche el recuento tanto en el suero como en la cuajada, y al retirar el queso de la salmuera, 24 h después del inicio del proceso de fabricación.

La contaminación inicial de la leche osciló entre 10.000 y 100.000 UFC/ml y estuviera probablemente representada por microorganismos termocófilos y otros añadidos tras la pasteurización en el transporte o en las primeras etapas del

Tabla RQ1 : Logaritmo de UFC/g registradas en las fases de la fabricación de quesos inoculados con diferentes cepas.

Fase	100	56	137	361
leche inicial	3.9	4.9	4.0	4.9
leche + Cl_2Ca + <i>S.aureus</i>	4.2 (a) 5.0 (b)	4.4	NE	4.5 5.2
leche + starter	4.8 6.0	4.5 5.6	NE	4.1 6.6
adición de cuajo	4.8 4.6	4.2 5.6	NE	4.3 6.8
suero	4.3 3.5	3.0 4.9	3.7 5.2	3.8 5.8
cuajada	5.0 4.9	4.6 5.8	3.9 5.1	3.9 7.0
1ª toma de queso (c)	5.1 6.6	4.6 6.2	3.8 5.7	3.4 6.6
				4.2 5.3
				4.2 6.8
				4.2 4.8

En cada recuadro, el valor superior (a) indica el logaritmo de UFC de *S.aureus* /g, mientras que el valor inferior (b), el de otras bacterias. NE: no estudiado. (c): toma de muestra 24 h tras la inoculación estafilocócica. En cada copa, la ramificación de la derecha corresponde a 0.1% de cultivo "starter", mientras que el de la izquierda a 1%.

Tabla RQ1 : (continuación)

	472	C	P
leche inicial	4.0	4.9	4.9
leche + Cl_2Ca + <u>S.aureus</u>	4.5 4.2	5.3	4.7 5.3
leche + starter	4.3 5.5	6.0	5.1 6.0
adición de cuajo	4.4 6.2	6.4	4.7 5.3
suero	NE	5.0	3.8 5.1
cuañada	3.9 5.0	6.7	4.0 6.1
suero tras la adición de PB			4.0 5.6
cuañada tras la adición de PB			3.0 5.5
1ª toma de queso	4.6 6.4	6.8	5.2 5.9

PB: tampón fosfato

proceso. La contaminación real por estafilococos se mantuvo en el rango entre 10.000 y 50.000, siendo la media de 30.000 UFC/ml.

Al analizar la evolución de los estafilococos se observa que en las diversas fases de la fabricación del queso no aparecen variaciones notables en los recuentos al comparar aquéllos en los que la concentración de cultivo iniciador era de 1% con los del 0.1%, a pesar de observarse crecimiento. Al final de la producción de la cuajada, los valores del logaritmo de UFC/ml oscilaron entre 3.9 (137-1% y 361-1%) y 5.3 (56-1%). Pero dicha diferencia entre los quesos preparados con el 1% y el 0.1% de cultivo iniciador ya es apreciable al sacar los quesos de la solución de salmuera. De esta forma, la media del logaritmo de UFC de estafilococos por gramo de todos aquellos quesos en los que la concentración del cultivo "starter" era de 1% fue en este momento de 4.45 (con valores entre los límites de 3.4 y 5.2, mientras que los correspondientes del 0.1% fue de 5.26 (límites de 3.8 y 6.1).

De forma individual, la cepa 100, al ser inoculada en leche para su procesamiento en queso sufrió un gran incremento inicial, desde 15.000 UFC/g, en la primera toma de muestra, cinco minutos después de su adición a la leche hasta 100.000 en la cuajada con el 1% de cultivo "starter", y hasta 50.000 cuando éste se encontró al 0.1%. La cepa 50 experimentó un incremento de casi un ciclo logarítmico en este mismo periodo, mientras que la 361 sufría un descenso de 30.000 a

2.500 ó 3.000. La cepa 472 disminuyó a la mitad (0.1%) o a la cuarta parte (1%), así como la cepa 100 con el valor de pH modificado por tampón fosfato, descendiendo de 50.000 a 10.000 UFC/g.

La microflora no estafilocócica presente en la leche tras la adición del cloruro cálcico osciló entre 10^5 y 1.6×10^6 . Apenas se observó diferencia entre aquellos contenedores en los que el cultivo láctico fue añadido a la leche en las concentraciones de 1 y de 0.1% en el caso de la cepa 100, pero para la cepa 56 los valores correspondientes fueron de 375.000 y 75.000 UFC/g, respectivamente, y en los quesos inoculados con las cepas 361 y 472 la diferencia fue de casi un ciclo logarítmico. La proporción entre microflora no estafilocócica en los quesos con 1% y 0.1% de cultivo "starter" se mantuvo también al añadir el cuajo.

Las pérdidas de microorganismos en el suero fueron cuantiosas, generalmente eliminándose el 50% de lo que permanece en la cuajada, e incluso en algunos casos (361-0.1 y 1%) registrándose en el suero mayor número de UFC/g que en la cuajada (Tablas RQ2 y RQ3).

Si se considera como cifra tipo de UFC/g la del queso control, la mayoría de los quesos presenta un recuento final de microflora no estafilocócica baja, excepto en los inoculados con la cepa 361 y el 472-0.1%.

Tabla RQ2 Pérdidas de microorganismos en el suero en el transcurso de la elaboración de los quesos.

Queso	S. aureus			Células no estafilocócicas		
	Adición cuajo	Suero	Cuajada		Suero	Cuajada
100 1%	1.102.000	242.000	650.000	696.000	40.800	318.000
100 0.1%	1.697.000	187.000	326.000	1.000.000	102.000	2.600.000
56 1%	315.000	11.000	199.000	6.960.000	977.000	3.280.000
56 0.1%	1.239.000	87.000	818.300	1.750.000	820.000	1.423.000
137 1%	NE	NE	NE	NE	NE	NE
137 0.1%	NE	NE	NE	NE	NE	NE
361 1%	349.000	69.400	51.600	110.000.000	9.000.000	45.000.000
361 0.1%	349.000	174.000	103.000	1.750.000	788.000	1.000.000
472 1%	NE	NE	NE	NE	NE	NE
472 0.1%	NE	NE	NE	NE	NE	NE
C				44.000.000	1.200.000	25.000.000
P	805.000	77.000	71.500	4.000.000	1.570.000	6.294.000

Los valores se expresan en células totales.

NE: no estudiado

Tabla R03: Distribución de los microorganismos en el suero y en la cuajada, con indicación del porcentaje de recuperación.

Cepa	% recuperación <i>S. aureus</i>						% recuperación "starter"					
	1%			0.1%			1%			0.1%		
	Recuperado	Suero	Cuajada	Recuperado	Suero	Cuajada	Recuperado	Suero	Cuajada	Recuperado	Suero	Cuajada
100	81	27	73	30	36	64	51.5	11	89	270	5	95
S6	66.6	5	95	73	10	90	61	23	77	128	37	63
137	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
361	35	57	43	79	63	37	49	17	83	102	56	44
472	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
C							59	5	95			
P							200	20	80			
E							NE	NE	NE	NE	NE	NE

B.2. VARIACIONES EN EL pH EN EL PROCESO DE FABRICACION (Tabla RD4)

Los valores iniciales de pH oscilaron entre 6.2 y 6.5, y este valor de pH disminuyó al añadir el "starter", siendo el descenso más notorio en los quesos en los que fue en la proporción de 1% cuando el pH inicial fue elevado (6.5) en relación con la acidez y el volumen de "starter" añadido. En el transcurso del proceso de fabricación se observó la tendencia a bajar, excepto en la leche inoculada con la cepa S6, en la que se registró un aumento de pH entre la muestra recogida al añadir el cuajo y la anterior, cuando se incorporó el cultivo iniciador, si bien este incremento fue de tan sólo 0.1 unidades de pH.

El suero fue más ácido que la cuajada en los quesos 100-1%, 100-0.1%, y 361-0.1%, manteniéndose el valor del pH de la cuajada igual al registrado cuando se agregó el cuajo. En los inoculados con la cepa S6, los valores fueron idénticos desde el comienzo del proceso hasta la introducción de la cuajada en los moldes. Tanto en el 361-1% como en el queso control se detectó el descenso del pH en el suero y en la cuajada, siendo esta disminución notable en la cuajada del 472-1%. Por el contrario en los quesos denominados 472-0.1% incrementó el valor de pH tanto en la cuajada como en el suero, siendo incluso en este último caso el pH de la cuajada 0.2 unidades

Tabla RQ4 : Valores de pH registrados en las fases de fabricación de quesos inoculados con diferentes cepas estafilocócicas.

Fase	100	56	137	361
leche inicial	6.5	6.5	6.2	6.4
leche + Cl_2Ca + <i>S.aureus</i>	6.5	6.5	6.2	6.4
leche + starter	6.4	6.4	NE	6.4
	6.5	6.5	6.0	6.4
leche + cuajo	6.4	6.5	NE	6.3
suero	6.3	6.5	NE	6.3
cuañada	6.4	6.5	NE	6.5
1ª toma de queso	5.5	5.4	5.5	5.5

(1)

NE: no estudiado.

(1): toma de muestra 24 h tras la inoculación estafilocócica.

En cada cepa, la ramificación de la derecha corresponde a 0.1% de cultivo "starter", mientras que el de la izquierda a 1%.

Tabla RQ4: (continuación)

Fase	472	C	P	E
leche inicial	6.2	6.5	6.5	6.2
leche + Cl_2Ca	6.2	6.5	6.5	6.2
leche + starter <i>S.aureus</i>	6.2	6.4	6.4	6.1
leche + cuajo	6.2	6.4	6.4	6.2
suero	6.1	6.3	6.5	NE
cuajada	5.9	6.3	6.5	NE
suero tras la adición de PB	6.4		6.7	NE
cuajada tras la adición de PB			6.9	
1ª toma de queso	5.4	5.5	5.4	5.2

(1)

PB: tampón fosfato

de pH superior al inicial. En la partida de leche que habría de transformarse en los quesos denominados P se observó cómo incrementaban ambos valores (cuajada y suero), aunque a diferencia de los 472-0.1% nunca rebasaron el valor de pH inicial.

B.3. VARIACIONES EXPERIMENTADAS EN LOS QUESOS CON pH MODIFICADO

Tras la rotura de la cuajada se procedió a eliminar la casi totalidad del suero y sustituirlo por un tampón fosfato, a fin de intentar regular el pH y ver el posible efecto de este parámetro sobre el desarrollo de los estafilococos. Al eliminar el tampón, éste presentaba un aspecto blanquecino y lechoso, diferente del amarillento turbio de los quesos en los que no se siguió esta práctica. Así mismo, la cuajada mostraba una consistencia diferente, siendo más friable. Muchos microorganismos fueron arrastrados, permaneciendo aproximadamente 1.000 células de *Staphylococcus aureus* y 300.000 UFC de cultivo "starter" por g de cuajada. No obstante, el recuento de UFC/g tras la permanencia en salmuera demostró que las cifras fueron muy similares a las de los otros quesos, tras exhibir una activa multiplicación, produciéndose siete u ocho generaciones de estafilococos, aunque la del cultivo "starter" permaneció un poco por debajo de la media de los demás quesos con la flora láctica añadida al 1%. En los

muestreos posteriores y hasta la finalización del periodo de maduración no se observaron diferencias marcadas con respecto a los quesos 100-1%, iguales a éstos en su proceso de fabricación excepto en la sustitución del suero por tampón fosfato.

B.4. VALORES DE DNAsa Y TNAsa OBTENIDOS (Tabla RQ5)

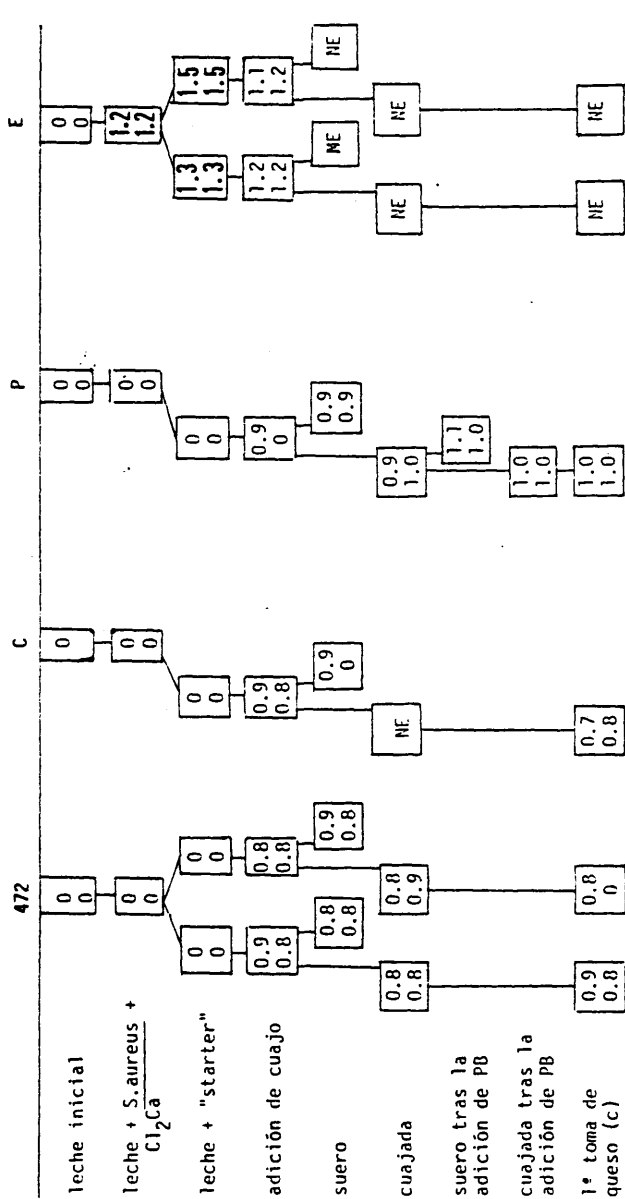
Las variaciones que sufrieron la actividad DNAsa y TNAsa a lo largo de la elaboración de los quesos se expresan en la tabla RQ5. Los valores fueron negativos en las primeras fases de la elaboración de los quesos. Tras la adición del cuajo se pudo apreciar una cierta actividad positiva, sin corresponderse con un incremento de los estafilococos y manteniéndose a todo lo largo del proceso. Durante el periodo de maduración, el queso control también mostró actividad DNAsa y TNAsa. Ante estos resultados se comprobó la actividad desoxirribonucleasa del cuajo diluido en agua destilada a la misma concentración que la utilizada en la fabricación del queso (2.5g/100L) obteniéndose un resultado fuertemente positivo, incluso en concentraciones inferiores a las óptimas de elaboración. Todos los quesos han arrojado resultados muy similares, oscilando el diámetro entre 0.7 y 1.3 mm.

Los quesos denominados E presentaron valores muy elevados de actividad DNAsa y TNAsa, incluso antes de la adición del

Tabla R05 : Valores de actividad DNAsa y TNAsa registrados en las fases de fabricación de quesos inoculados con distintas cepas.

	100	S6	137	361
leche inicial	0 0	0 0	0 0	0 0
leche + <i>S.aureus</i> + Cl_2Ca	0 0	0 0	NE NE	0 0
leche + "starter"	0 0	0 0	NE NE	0 0
adición de cuajo	0.8 0.8	1.0 0.9	NE NE	0.8 0.8
suero	0.9 0.8	0.9 0	0 0.8	1.0 0.8
cujada	0.9 0.9	1.6 0	0.7 0.7	0.9 0
1ª toma de queso (c)	0.8 1.0	1.0 1.0	0.9 0.7	0.8 0.8

En cada recuadro, el valor superior (a) indica el valor de actividad DNAsa, mientras que el inferior (b) el de TNAsa, ambos expresados en mm. NE: no estudiado. (c): toma de muestra 24 h tras la inoculación estafilocócica. En cada cepa, la ramificación de la derecha corresponde a 0.1% de cultivo "starter", mientras que la de la izquierda a 1%.



PB: tampón fosfato.

Tabla RQ6: Valor medio del logaritmo de UFC/g habidos en quesos inoculados con las diferentes cepas.

Cepa	log UFC/g "starter"						log UFC/g <u>S. aureus</u>					
	1%			0.1%			1%			0.1%		
	G	P		G	P		G	P		G	P	
100	7.1	7.1		7.3	7.3		5.9	5.3		6.3	6.0	
S6	6.7	6.8		7.1	7.1		5.0	6.8		6.1	6.1	
137	6.6	6.4		6.6	6.4		4.8	3.9		5.2	4.6	
361	6.7	6.8		6.9	7.1		4.3	3.3		4.5	4.7	
472	6.9	6.8		7.0	7.0		4.9	5.0		6.3	5.9	
C	6.9	6.9										
P	6.7	7.0					5.4	4.9				
E	7.05			6.9								

G= queso grande; P= queso pequeño

Tabla RQ7: (Continuación)

Queso	Días de maduración											
	13	15	18	20	22	29	35	42	49	52		
100 0.1	-	-	-	-	-	0.7	-	-	0.9	0.9		
100 1	0.7 0.8		-	-	-		0.7 0.6	1.3 1.1	1.0 1.0			
S6 0.1	1.2 1.2		0.9 1.2	1.3 1.1	1.2		0.9 1.0	0.7 1.0	0.9 1.0			
S6 1	-		0.9 1.0	0.9 0.9			-	1.0 0.9	1.3 1.0			
137 0.1		-		0.7 1.0	1.2 1.0	0.7	-	1.2 0.9		0.7	-	
137 1		-		-	1.0 0.9	0.7	-	1.3 1.0		0.9	-	
361 0.1			-	1.0	-	0.7 0.6	0.7 0.6	0.8 1.0	-			
361 1			1.0 0.7	-	0.8	-	0.7 0.6	0.8 0.8	-			
472 0.1		0.9 0.9		1.1	-		0.8 0.6	1.3 0.9		0.9 1.0		
472 1		- 0.8		1.0	-		0.9 0.7	1.1 0.7		1.1 1.0		
C			0.7 1.0	-	1.1		0.6	0.9 0.8	0.8			
P			0.7 1.1	0.8 1.1			0.7	1.0 1.1	1.1 1.1			
E 0.1		1.0 1.2			1.0 1.0	1.3 1.3	1.1 1.1	1.0 1.0				
E 1		1.0 0.8			1.1 1.1	1.0 0.9	1.1 1.0	1.1 1.0				

cuajo. Debido a este resultado, se comprobó la capacidad de la enterotoxina con la que habían sido contaminados de inducir actividad desoxirribonucleasa, observándose que ésta era muy elevada, por lo que dicho producto probablemente no estuviera muy purificado, permaneciendo el enzima en el mismo.

B.5. EVOLUCION DE LOS MICROORGANISMOS A LO LARGO DEL PERIODO DE MADURACION

B.5.1. SALADO EN SALMUERA (Tabla RQ1)

En las 20 h transcurridas entre la introducción de la cuajada en los moldes y la toma de muestra inmediatamente tras sacar los quesos de la solución de salmuera, en aquéllos inoculados con las cepas 100, S6 y 472 se propició más la multiplicación de células estafilocócicas por la adición de 0.1% de cultivo "starter" que en los inoculados con otras cepas (137 ó 361).

En todos los casos el recuento de células estafilocócicas fue superior cuando el "starter" se agregó a la concentración del 0.1%. Cuando éste se añadió a la concentración del 1% los estafilococos apenas experimentaron incremento en el número (cepa 100) ó incluso sufrieron una disminución (cepas S6, 137 y 361). No obstante, en la cepa 472, coincidiendo con la cuajada más ácida de todas, el número de células de *S. aureus*

se multiplicó cinco veces, mientras que en los quesos denominados P este incremento fue muy notable, de dos ciclos logarítmicos, aunque su nivel de contaminación era el más bajo (1000 UFC/g).

Cuando la concentración del "starter" fue del 0.1%, el recuento de UFC/g de células no estafilocócicas experimentó un notable incremento en los quesos inoculados con las cepas 100, S6, 137 y 472, pero sin embargo disminuyó en la cepa 361.

B.5.2. PERIODO DE MADURACION (Tablas RQ6, RQ7 y RQ8; Figuras RQ1 a RQ13)

El "starter" se mantuvo entre los valores logarítmicos de 6 y 8 a lo largo de todo el periodo de maduración, sin observar ninguna relación con las concentraciones del 1 y del 0.1% iniciales, como ya se manifestó en las primeras fases de elaboración de los quesos. En la tabla RQ6 se observa que la media de los valores de los recuentos oscila entre 2.5×10^6 (137) y 2×10^7 (100-0.1%), siendo en los quesos con 0.1% de cultivo "starter" ligeramente superiores.

El tratamiento estadístico de "comparación de dos medias" indicó que la diferencia entre los quesos preparados con el 0.1% y el 1% de cultivo iniciador era significativa, ya que su valor fue de 3.97, superior a 2.6 que indicaría diferencia

Figura RQ.1: Representación gráfica del desarrollo de la flora láctica y estafilocócica en quesos inoculados con *S.aureus* cepa 100 y el 0.1% de cultivo "starter".

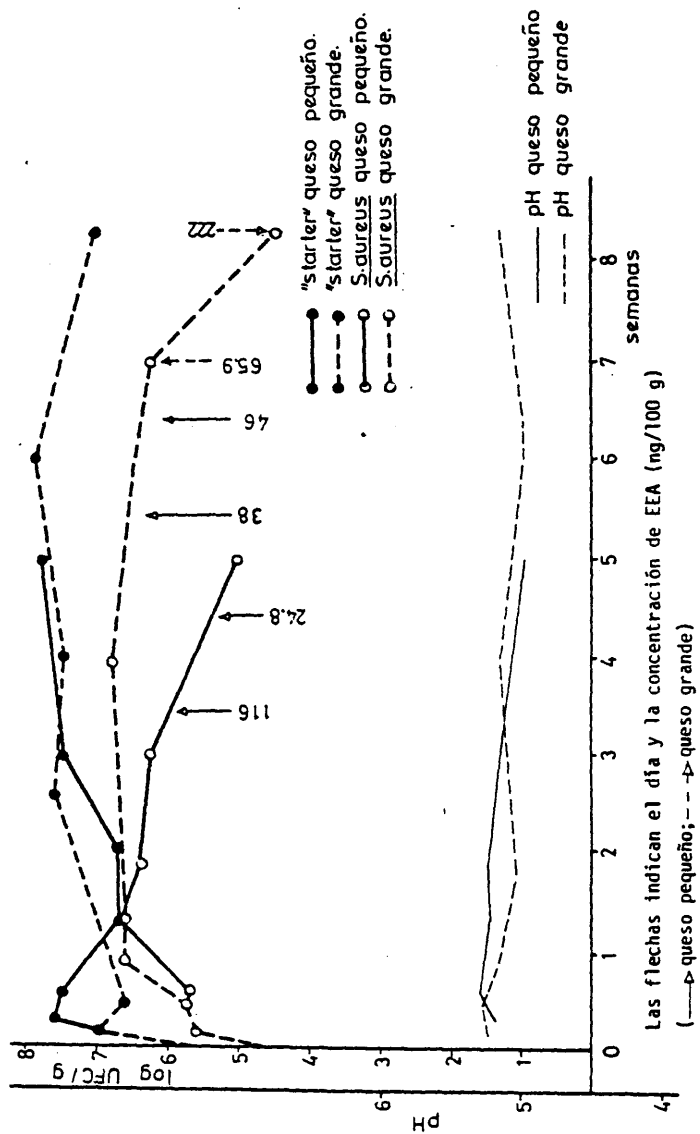


Figura RQ 2: Representación gráfica del desarrollo de la flora láctica y estafilocócica en quesos inoculados con S.aureus cepa 100 y el 1% de cultivo "starter".

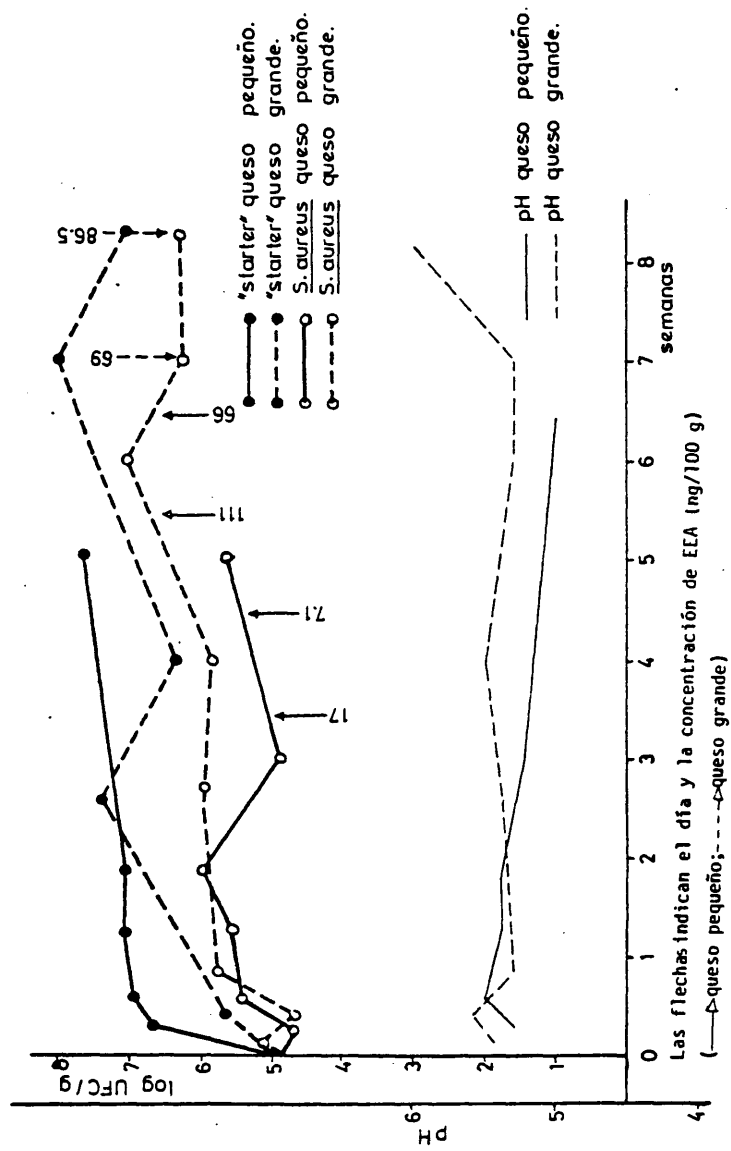


Figura PQ 3: Representación gráfica del desarrollo de la flora láctica y estafilocócica en quesos inoculados con *S.aureus* cepa S 6 y el 0.1% de cultivo "starter".

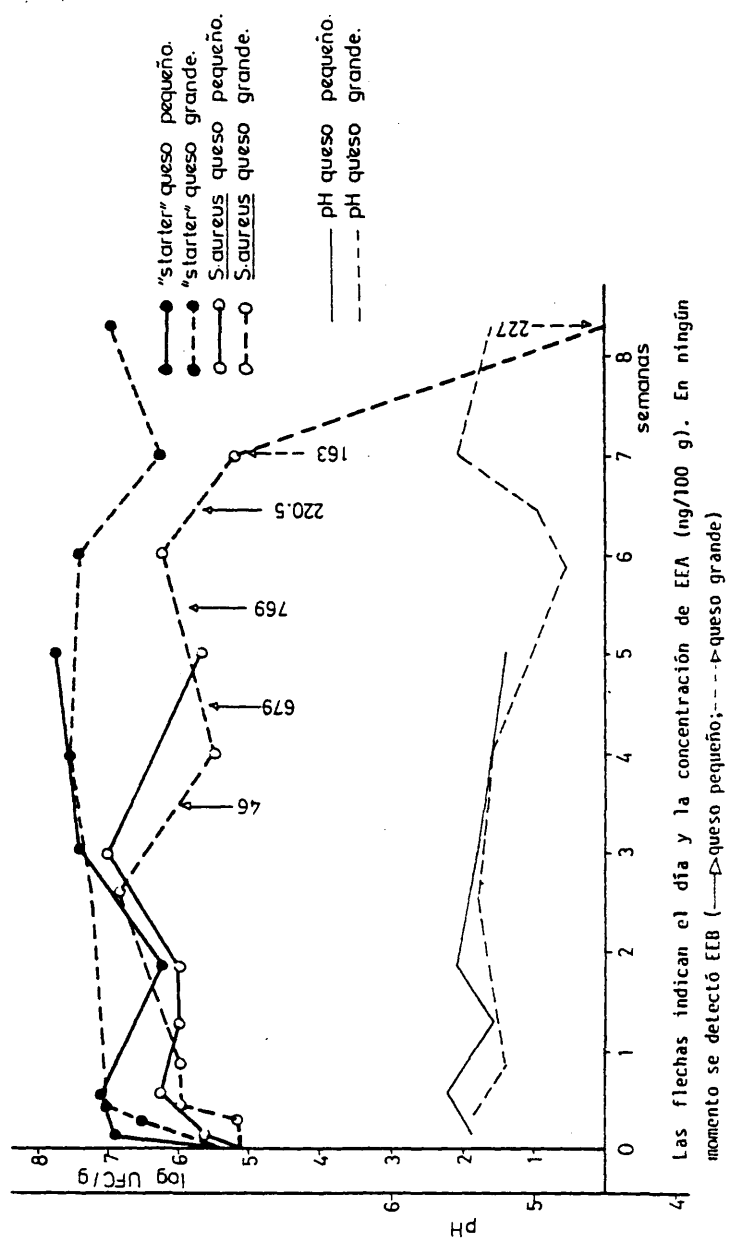


Figura RQ 4: Representación gráfica del desarrollo de la flora láctica y estafilocócica en quesos inoculados con *S.aureus* cepa S 6 y el 1% de cultivo "starter".

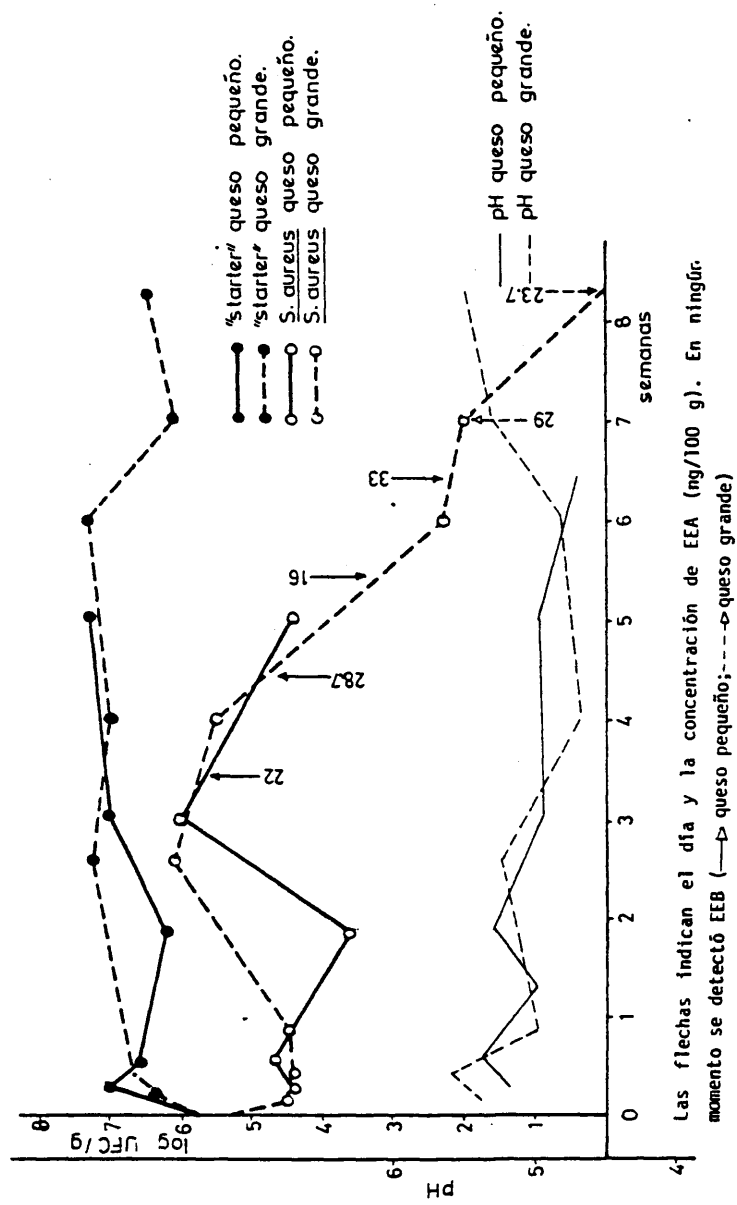


Figura RQ 5: Representación gráfica del desarrollo de la flora láctica y estafilocócica en quesos inoculados con *S. aureus* cepa 137 y el 0.1% de cultivo "starter".

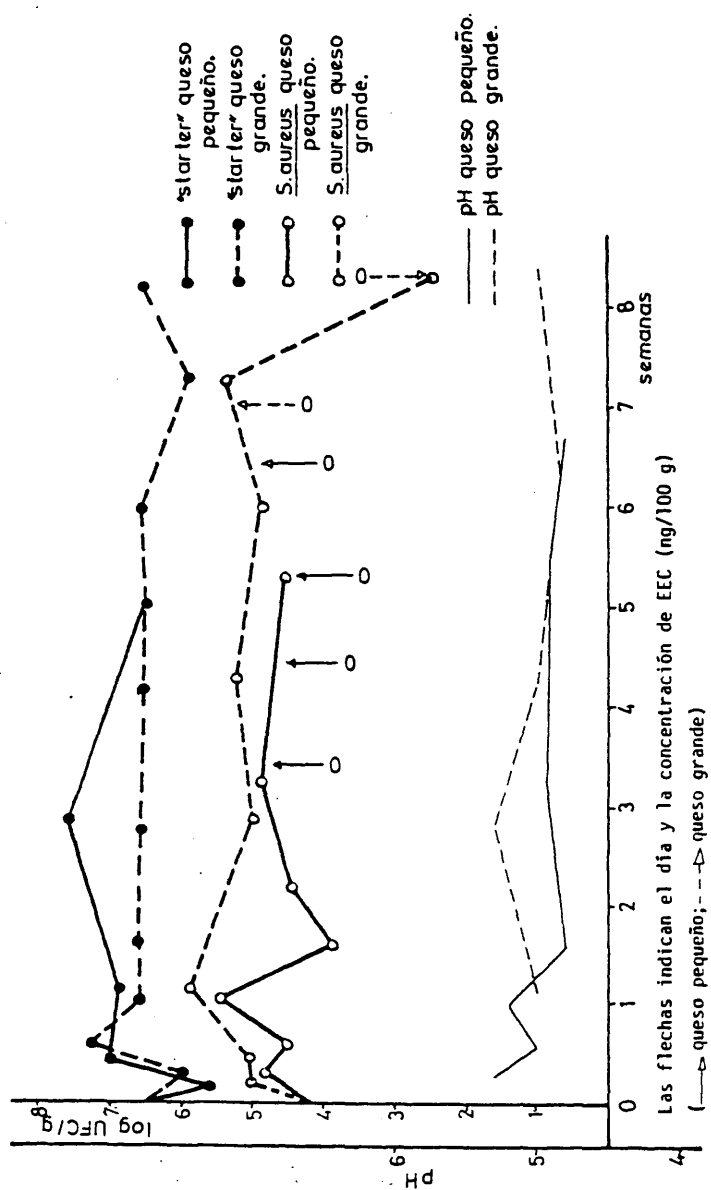


Tabla RQ5: (continuación)

	472	C	P	E
leche inicial	0 0	0	0 0	0 0
leche + <i>S. aureus</i> + Cl_2Ca	0 0	0 0	0 0	1.2 1.2
leche + "starter"	0 0	0 0	0 0	1.3 1.3
adición de cuajo	0.9 0.8	0.9 0.8	0.9 0	1.2 1.2
suero	0.8 0.8	0.9 0	0.9 0.9	1.5 1.5
cuajada	0.8 0.8	NE	0.9 1.0	1.1 1.2
suero tras la adición de PB	0.8 0.9	NE	1.1 1.0	NE
cuajada tras la adición de PB	0.9 0.8	0.7 0.8	1.0 1.0	NE
1ª toma de queso (c)	0.8 0		1.0 1.0	NE

PB: tampón fosfato.

Figura RQ6: Representación gráfica del desarrollo de la flora láctica y estafilocócica en quesos inoculados con *S. aureus* cepa 137 y el 1% de cultivo "starter".

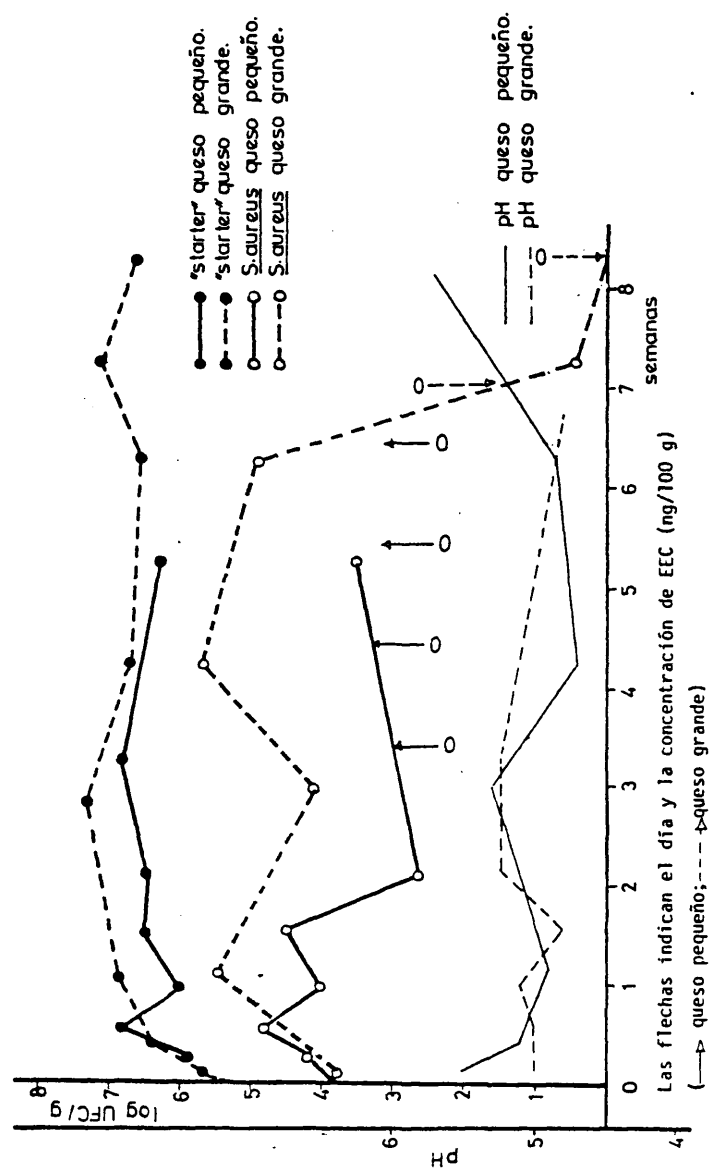


Tabla RQ7: Actividad DNasa y TNasa registrada a lo largo del periodo de maduración en los distintos quesos.

Queso	Días de maduración											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	
	DNAS ₁ TNAS ₁	DNAS ₂ TNAS ₂	DNAS ₃ TNAS ₃	DNAS ₄ TNAS ₄	DNAS ₅ TNAS ₅	DNAS ₆ TNAS ₆	DNAS ₇ TNAS ₇	DNAS ₈ TNAS ₈	DNAS ₉ TNAS ₉	DNAS ₁₁ TNAS ₁₁	DNAS ₁₂ TNAS ₁₂	
100	0.1	0.7 1.0 0.8 0.6	1.0 -	- 1.0 0.7 0.7	- -	0.7 0.7	-		-			
100	1	0.8 1.0 0.7 0.7	0.8 0.8	- 0.8 0.6 0.6		0.6 0.6			0.6 -			
S6	0.1	0.8 -	0.9 0.8	- 1.1 -	- 0.7 0.8				0.8 0.9			
S6	1	1.0 1.0 1.1	1.0 0.9 0.9	- 0.7 0.6 -					- 0.6			
137	0.1	0.9 0.7 1.0 0.8	1.1 1.0 1.0 0.9				- 0.7 0.7 -	-		0.7 -		
137	1	0.9 0.9 0.8 0.8	0.8 0.9 1.0 0.8				0.8 -	-		0.7 -		
361	0.1	0.8 0.8 0.9 0.8	0.7 0.7					0.6 -			0.7 -	
361	1	0.8 0.8 0.7	0.7 0.7					-			1.0 -	
472	0.1	0.8 -	0.8 0.9 1.2 1.2	1.3 1.0				0.9 0.8 0.8 -		0.7		
472	1	0.9 0.8 0.8 0.8	0.9 0.8 1.0 0.9					0.8 0.8 0.6 0.7		-		
C		0.7 0.8 0.8 0.8	0.8 0.7 0.7 0.7					-			0.8	
P		1.0 0.9 0.7 0.9	0.7 - 0.9 0.9					-		-	0.8 0.85	
E	0.1	-		1.2 1.2			0.7 1.2				0.1 0.9	
E	1		1.3 1.2				0.7 1.2				1.0 0.8	

La actividad DNasa y TNasa se expresa como diámetro del halo (cm)

(-): valor inferior a 0.7.

Figura RQ 7: Representación gráfica del desarrollo de la flora láctica y estafilocócica en quesos inoculados con *S. aureus* cepa 361 y el 0.1% de cultivo "starter".

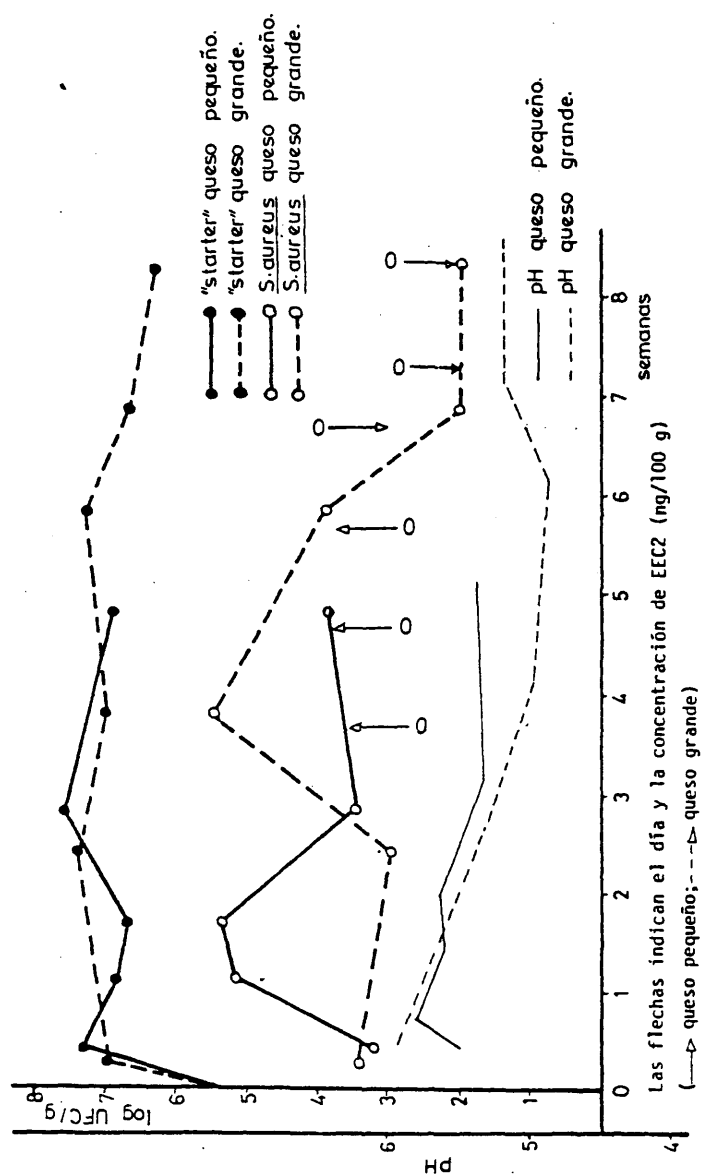


Figura RQ 8: Representación gráfica del desarrollo de la flora láctica y estafilocócica en quesos inoculados con *S.aureus* cepa 361 y el 1% de cultivo "starter"

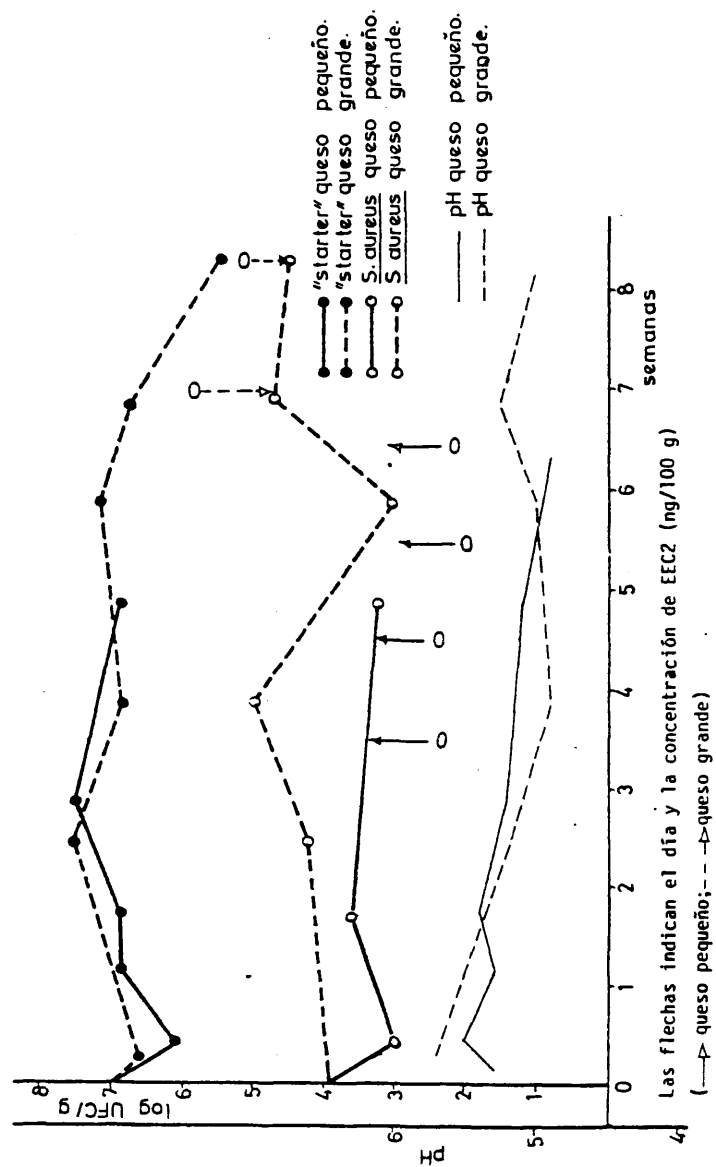


Figura RQ 9: Representación gráfica del desarrollo de la flora láctica y estafilocócica en quesos inoculados con *S. aureus* cepa 472 y el 0.1% de cultivo "starter".

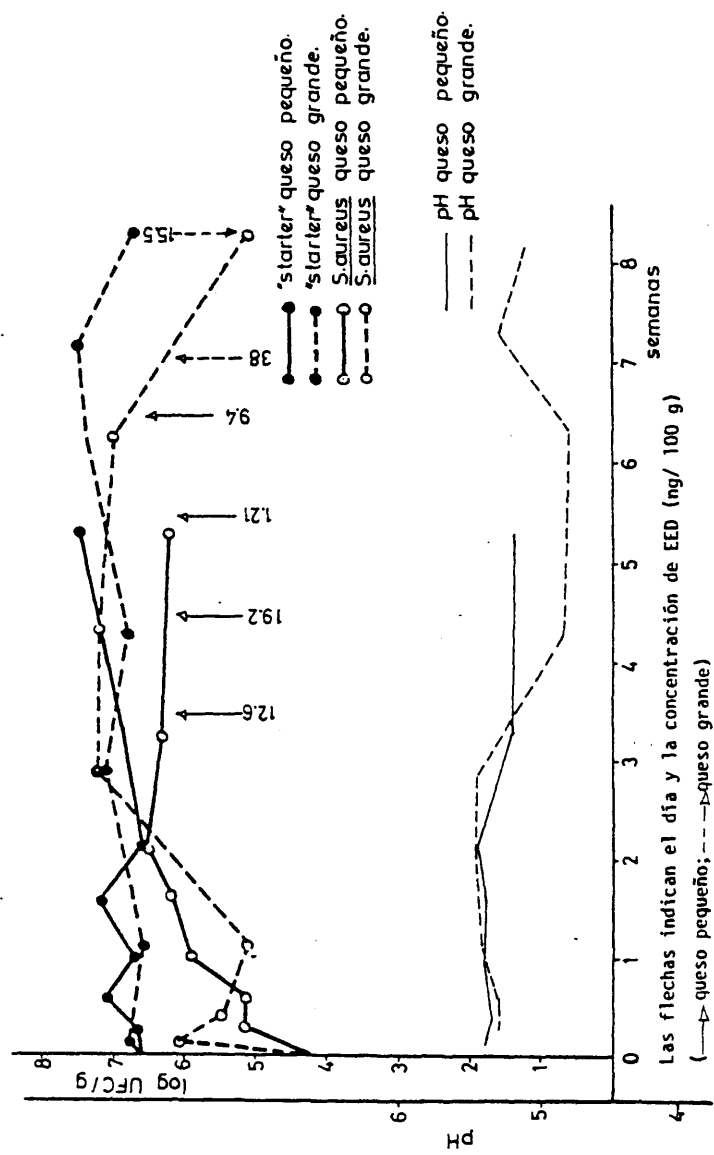


Figura RQ 10: Representación gráfica del desarrollo de la flora láctica y estafilocócica en quesos inoculados con *S. aureus* cepa 472 y el 1% de cultivo "starter".

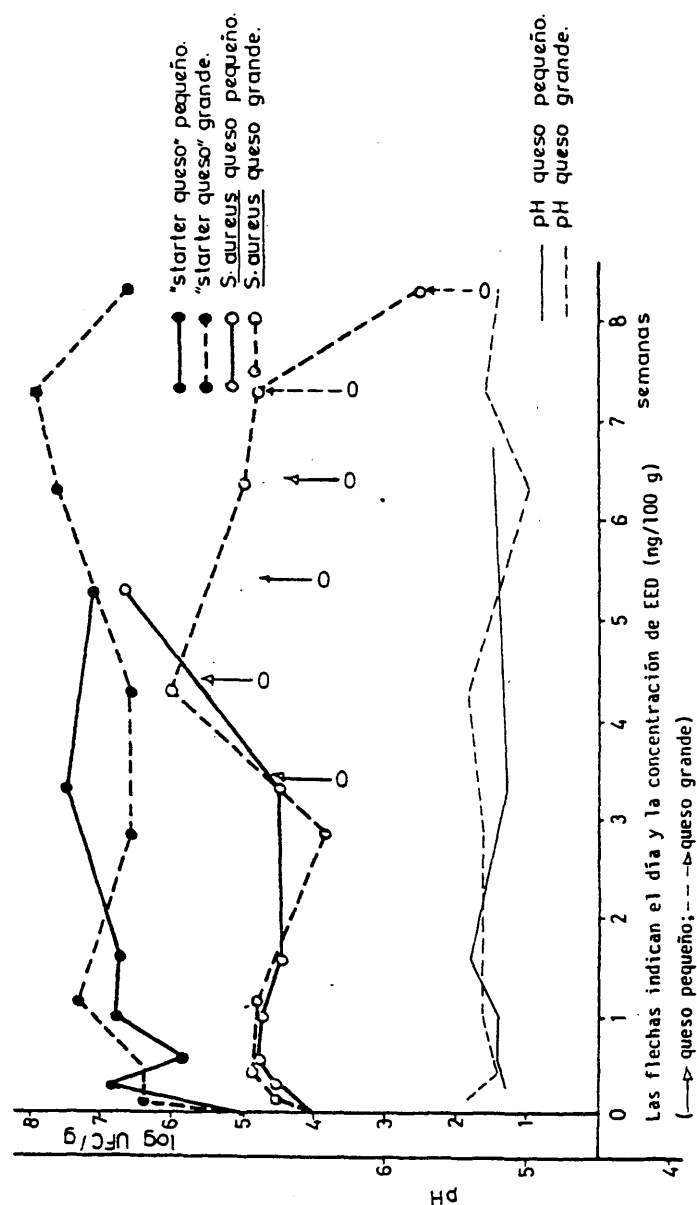


Figura RQ 11: Representación gráfica del desarrollo de la flora láctica en quesos control. Cultivo starter 1%.

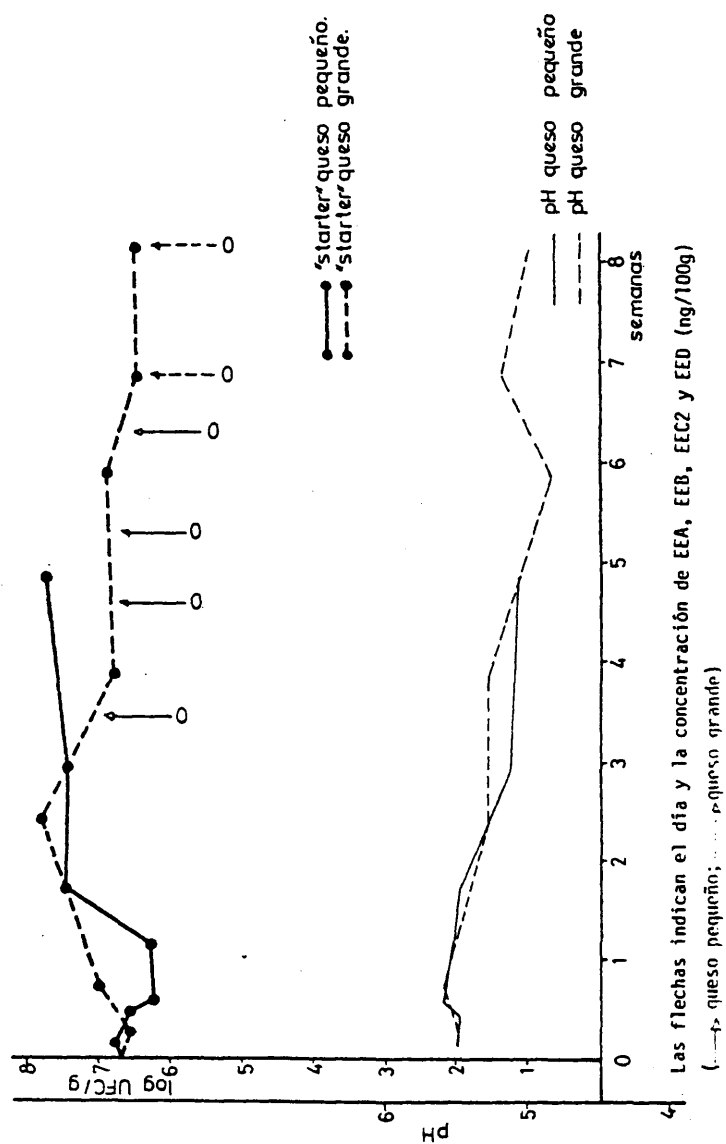
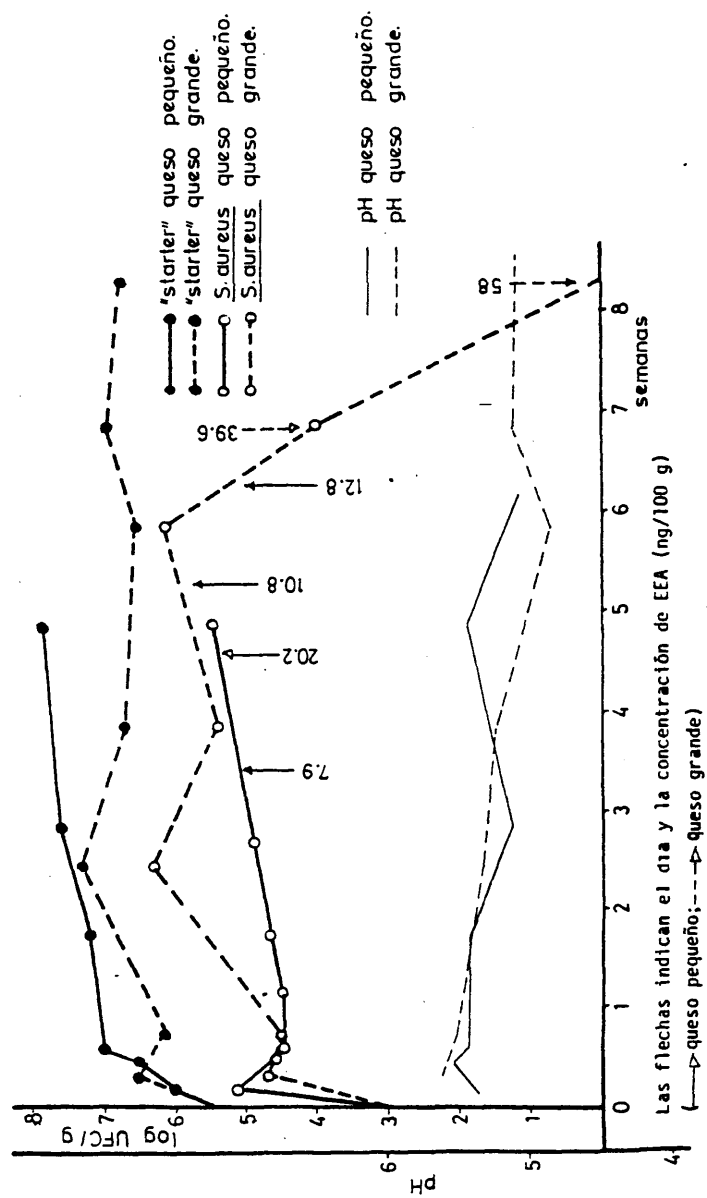
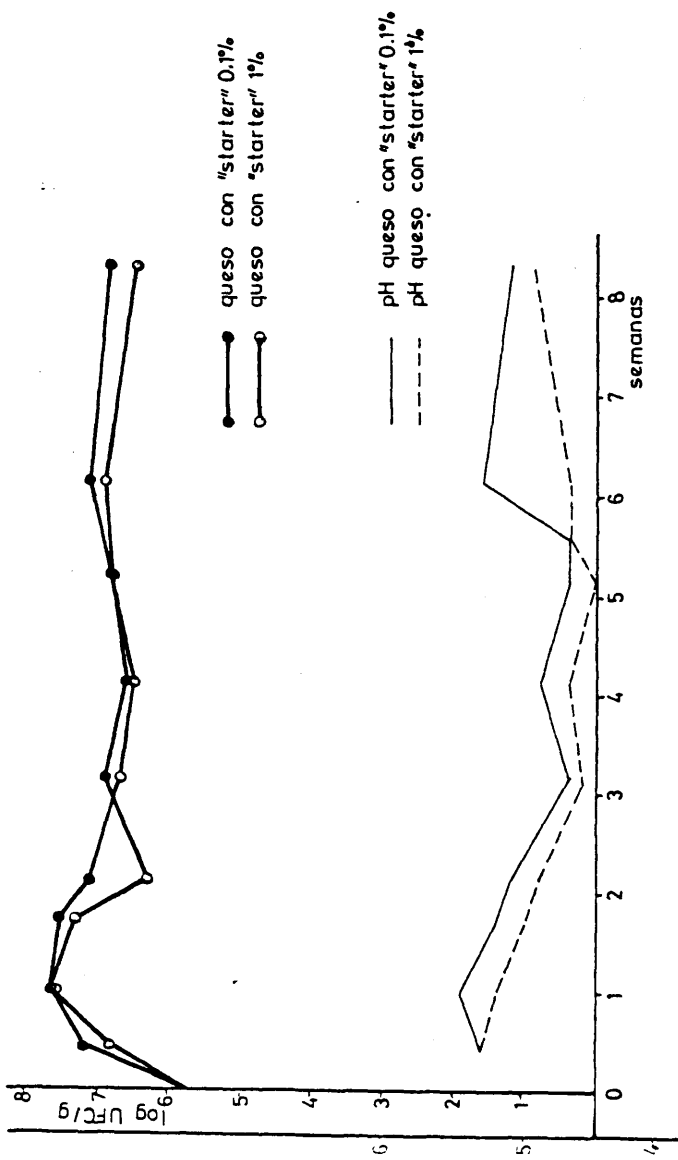


Figura RQ 12: Representación gráfica del desarrollo de la flora láctica y estafilocócica en quesos inoculados con *S. aureus* cepa 100 y el 1% de cultivo "starter" con el pH regulado por fosfato.



jura Rq 13: Representación gráfica del desarrollo de la flora láctica en quesos con enterotoxinas
 A y B adicionadas de forma artificial.



entre los límites de confianza del 99%. Los valores estadísticos para ambas concentraciones de "starter" en los quesos fueron los siguientes:

	0.1%	1%
media	5.5	4.79
desviación	0.97	1.09

La diferencia entre los quesos en los que se había empleado moldes grandes y los pequeños fue especialmente evidente en el recuento de estafilococos, pero en la "comparación de dos medias", el valor 't' resultó ser de 0.99, por lo que esta diferencia se consideró no significativa. Este mismo resultado fue arrojado al comparar la relación entre células estafilócicas : células no estafilocócicas de los quesos grandes y pequeños ('t' = 0.84).

En la cinética de las distintas constantes a lo largo del periodo de maduración se observa que por lo general la dinámica del cultivo "starter" y de la cepa de estafilococos en cuestión siguen tendencias inversas, incrementando una cuando disminuye la otra, ofreciendo una imagen especular de simetría bilateral. El pH suele seguir una curva paralela a la de los estafilococos, es decir, a medida que incrementa el número de células del "starter", disminuye el valor de pH, forzando una disminución de los estafilococos. El "starter" sigue una evolución cíclica, disminuyendo su número y

ascendiendo el pH, por lo que los estafilococos experimentan otro ascenso.

En la mayoría de los quesos se produce una disminución drástica de estafilococos a partir del día 35 a 42. Así, en muchos de ellos (S6-0.1%, S6-1%, 137-1% y P) no se detectan estafilococos ya en el día 58, mientras que en otros (137-0.1%, 361-0.1%, 472-1%) el recuento en ese día fue inferior o igual a 1.000 UFC/g. Por el contrario, en los quesos 100-0.1%, 100-1% y 472-0.1% en el día 58, último día de maduración, el recuento fue de 3×10^4 , 2.36×10^6 y 1.2×10^5 UFC/g, respectivamente. Hay que hacer constar que tras el día 38 todos los recuentos se verificaron en el queso grande de cada tipo.

La figura RQ11 representa la evolución del "starter" y del pH en el queso control, no influenciado por estafilococos. El valor de pH se mantiene más estable, la disminución más homogénea y excepto en el día 48 no sube en ningún punto. Esta subida en este día corresponde con la disminución del "starter" cuando alcanza su mínimo (6.5). En la mayoría de los quesos se ha experimentado una subida en estas fechas coincidiendo generalmente con la presencia de un gran número de células muertas (de origen estafilocócico) o con una disminución del "starter".

La cifra máxima de estafilococos detectados en cada uno de los quesos es la que se muestra en la tabla RQ8.

Tabla RQ8: Valor máximo de recuento de estafilococos (UFC/g) detectado en los quesos, con indicación del día de maduración en que se obtuvo.

Queso	UFC/g	Día
100 0.1% (G)	6.400.000	28
100 0.1% (P)	5.000.000	9
100 1% (G)	10.450.000	42
100 1% (P)	840.000	13
S6 0.1% (G)	6.950.000	18
S6 0.1% (P)	9.200.000	21
S6 1% (G)	1.250.000	18
S6 1% (P)	875.000	21
137 0.1% (G)	685.000	8
137 0.1% (P)	255.000	7
137 1% (G)	505.000	30
137 1% (P)	65.500	4
361 0.1% (G)	125.000	27
361 0.1% (P)	220.000	12
361 1% (G)	100.000	27
361 1% (P)	4.000	27
472 0.1% (G)	17.400.000	30
472 0.1% (P)	3.360.000	15
472 1% (G)	1.120.000	30
472 1% (P)	4.900.000	37
P (G)	2.150.000	18
P (P)	310.000	35

Tabla RQ9: Evolución de la concentración de Enterotoxinas (ng/100g) detectadas mediante el método ELISA a lo largo del periodo de maduración de los quesos.

		días de maduración							
		EET	P					G	
Queso			16	24	31	38	45	49	58
100	0.1	A	NE	116	24.8	38	46	65.5	222
100	1	A	NE	17	71	111	66	69	86.5
S6	0.1	A	NE	46	679	769	220.5	163	227
		B	NE	0	0	0	0	0	0
S6	1	A	NE	22	28.7	16	33	29	23.7
		B	NE	0	0	0	0	0	0
137	0.1	C ₁	NE	0	0	0	0	0	0
137	1	C ₁	NE	0	0	0	0	0	0
361	0.1	C ₂	NE	0	0	0	0	0	0
361	1	C ₂	NE	0	0	0	0	0	0
472	0.1	D	NE	12.6	19.2	1.21	9.4	38	15.5
472	1	D	NE	0	0	0	0	0	0
P		A	NE	7.9	20.2	10.8	12.8	39.6	58
E	0.1	A	1239	507	1307	536	1691	NE	934.8
		B	770	356	580	460	822	NE	731
E	1	A	NE	657	1541	1351	1278	NE	717
		B	NE	517	846	860	742	NE	250

EET: Enterotoxina.

NE: No estudiado.

La actividad DNAsa y TNAsa mostrada a lo largo del periodo de maduración en los distintos quesos es la que se indica en la tabla RQ7. El dato más relevante es la falta de concordancia entre la actividad DNAsa y el recuento de estafilococos, así como la presencia casi constante de actividad en los quesos control, llegando incluso a alcanzar en determinados días diámetros superiores a 1.0 centímetro. Por otro lado, también hay que llamar la atención sobre el hecho de que en algunos quesos se detectó enterotoxina, mientras que la actividad DNAsa era casi despreciable ($100-0.1$ y $100-1$).

B.6. SINTESIS DE ENTEROTOXINAS A LO LARGO DEL PERIODO DE MADURACION (tabla RQ8)

De la comparación de las tablas RQ8 y RQ9 se deduce que la cifra de recuento mínima que ha permitido la detección de enterotoxinas ha sido de 310.000 UFC/g en el caso del queso P (P). En ninguno de los quesos se detectó enterotoxina C1 ni C2.

Es de resaltar el hecho de que en los quesos inoculados con la cepa S6 no se detectara enterotoxina B, supuestamente producida por estos microorganismos en grandes cantidades, y sin embargo se observara la presencia de enterotoxina A, secretada en cantidades traza en otras circunstancias. Este resultado paradójico fue más evidente en S6-0.1%, en las dos

variedades de tamaño, registrándose incluso cantidades superiores a las de 100-0.1%, cepa considerada como fuerte productora de EEA.

La relación entre la media de la cantidad de enterotoxina secretada por los quesos preparados con el 0.1% y el 1% de cultivo iniciador se encuentra siempre desplazada en favor del más diluido, coincidiendo en todos los casos con un crecimiento más notable de los estafilococos en esos quesos con respecto a los preparados con 1% de "starter".

Excepto en el caso de la secreción de EEA por parte de la S6, la media de la producción de enterotoxina ha sido superior en los quesos grandes que en los pequeños, correspondiendo en todos los casos con un recuento máximo de UFC de estafilococos por gramo inferior (tabla R08). En S6-0.1% se obtuvo un valor superior de UFC/g en el queso pequeño que en el grande coincidiendo con una mayor cantidad de enterotoxina detectada en el primero que en el segundo.

C. DISCUSION

C.1. DESARROLLO DE ESTAFILOCOCOS EN EL PROCESO DE ELABORACION

C.2. DESARROLLO DE FLORA NO ESTAFILOCOCCICA EN EL PROCESO DE
ELABORACION

C.3. EVOLUCION DEL LOS VALORES DE pH

C.4. VALORES DNasa Y TNasa OBTENIDOS

C.5. PERDIDAS DE ESTAFILOCOCOS EN EL SUERO

C.6. DIFERENCIAS DE RECuentOS EN LAS PRIMERAS 24 h
(SALAZONADO)

C.7. PERIODO DE MADURACION

C.7.1. EVOLUCION DE LOS ESTAFILOCOCOS

C.7.2. EVOLUCION DEL pH

C.7.3. SINTESIS DE ENTEROTOXINAS

Dado que hemos obtenido valores muy dispares en todos las muestras, a pesar de haber seguido un protocolo idéntico en cuanto a cantidades y tiempos en la elaboración de los quesos, de los resultados obtenidos se deduce que son muchos los factores que intervienen en el crecimiento y en la producción de enterotoxinas en los quesos. No obstante, es evidente que en un proceso normal de elaboración de quesos de tipo manchego pueden darse las circunstancias precisas para que los estafilococos presentes se multipliquen, alcanzando

cifras peligrosas por poder secretar enterotoxinas, y representando por lo tanto un peligro potencial para la salud del consumidor.

La escasez de bibliografía existente sobre la contaminación estafilocócica en queso manchego nos impide comparar nuestros datos con los hallados por otros autores en este tipo de queso. No obstante, la tecnología de los quesos Cheddar y Colby comparte algunas semejanzas con la del tipo manchego.

Debemos hacer constar que el aspecto externo y cualidades organolépticas de los quesos contaminados fueron siempre idénticas a las de los quesos control, en cuanto a aroma, textura y color, y que, aun no procediendo a identificar la flora no estafilocócica, en ningún momento se produjeron fermentaciones anormales ni contaminaciones no deseadas. Todos los quesos mostraron una contaminación exterior por diversas especies del género Penicillium. Consultada la empresa quesera que colaboró con nosotros en esta experiencia, aconsejaron retirar los hongos periódicamente con un paño húmedo. Mencionaremos que no llegaron a desaparecer hasta el momento del parafinado del queso.

El uso de logaritmos (en el tratamiento de los resultados tanto de este alimento como de los otros dos -mayonesa y leche condensada) se justifica por la necesidad de comparar cifras que a primera vista podrían parecer dispares, pero que en realidad no lo son dada la capacidad de multiplicación de

los microorganismos. En concreto, hemos podido constatar que en el proceso de elaboración del queso el periodo generacional de los estafilococos llegó incluso a ser de 30 minutos, mientras la leche se mantuvo a 32-35°C. Por lo tanto, la diferencia de un ciclo logarítmico representa 3-4 generaciones. Tal decisión nos obligó a realizar estudios estadísticos con estas constantes del número, aun a sabiendas que las operaciones con logaritmos no corresponden al logaritmo de la misma operación con antilogaritmos.

Experimentos preliminares demostraron que el uso de un macerador tipo Ten Broeck no era adecuado por la formación de una masa semisólida no homogénea, así como por el elevado número de muestras a procesar en un mismo día. Al no disponer de un macerador conveniente para introducir en los botes donde depositábamos la muestra de queso hubimos de acudir, tras añadir 20 ml de agua de peptona al 1% con 0.1% de Tween 20 sobre 10 g de muestra, a congelar la misma para, utilizando una espátula esterilizada a la llama, incrementar la fricción entre las moléculas al encontrarse en estado sólido. Siguiendo tal procedimiento, obteníamos una pulverización del queso comparable a la que se conseguiría haciendo uso de macerador.

Realizando tres recuentos de muestras concretas en diferentes ocasiones y congelando en los intervalos se pudo constatar que el efecto causado sobre las células era de 5-8% de destrucción en cada periodo de congelación-descongelación.

BERRY et al. (1984) analizaron qué efectos surtían la congelación y la descongelación sobre la población estafilocócica asentada en hígados de ternera. Indicaron que los recuentos eran similares a los iniciales si se producía una descongelación rápida. Por el contrario, si la descongelación era lenta, permaneciendo la muestra durante periodos elevados de tiempo a temperaturas de 0 a 10°C se fomentaba el desarrollo de otros microorganismos que competían con lo estafilococos.

Una vez obtenida la muestra del queso procedíamos a rellenar el orificio efectuado con parafina estéril fundida. Tal práctica, si bien elevaba la temperatura en el microambiente circundante, aunque no en grado suficiente como para fundir las grasas o para destruir parte de la microflora presente, aseguraba que las condiciones en el interior de la pieza de queso no sufrirían alteraciones en cuanto a la tensión de oxígeno o a la implantación de hongos que pudiera afectar el desarrollo ulterior de los microorganismos.

El método descrito en Standard Methods for the Examination of Dairy Products (1978) recomienda utilizar citrato sódico al 2% (p/v) en solución ringer al cuarto a 40°C para hacer las diluciones de las muestras tomadas de queso. Dada la necesidad de realizar las valoraciones (pH, actividades DNAsa y TNAsa, recuento de microorganismos) con una muestra única (el estudio debía prolongarse por espacio de dos meses con

solución básica (pH 8.0) y con capacidad tampón que podría afectar el valor de pH. FETERKIN et al. (1985) indican que obtuvieron resultados similares al realizar las diluciones con una solución de citrato que con agua de peptona. Basándonos en este hecho acordamos diluir las muestras de queso en agua de peptona adicionada de Tween 20, a fin de evitar la formación de glóbulos lipídicos.

En el medio propuesto por Núñez (1980) los estafilococos se diferenciaban por su morfología, destacándose como colonias más grandes que las de la flora no estafilocócica, de bordes enteros y redondeados y en todas las cepas, excepto en la S6, por su tonalidad amarillenta. En el medio de agar de Baird-Parker sólo se contabilizaban las colonias que presentaban un brillo metálico, de color negro intenso y con dos halos alrededor, uno de opacidad por lipólisis y otro de aclaramiento por una lipasa (BAIRD-PARKER, 1962). La diferencia de recuento de estafilococos entre los medios de Baird-Parker y Núñez ha estado generalmente desplazada hacia el primero, representando por lo común el recuento en el segundo medio el 73.3% del primero. Consideramos que el medio de Núñez incluye tanto principios inmediatos como sustancias inorgánicas que permitirían el desarrollo favorable de los estafilococos. Por lo tanto, una inhibición tan sólo podría justificarse por un balance favorable para la flora no estafilocócica que por hallarse en ocasiones en la relación 100:1 podría competir por los nutrientes del medio con los estafilococos, enmascarando los resultados.

FITZ y OWENS (1978) analizaron la efectividad de diversos medios selectivos para enumerar los estafilococos presentes en queso Cheddar. Estos medios fueron agar Kranep, agar de manitol-sal, medio No 110 para Staphylococcus y agar de Baird Parker, registrando crecimiento tan solo en este último. Por lo tanto, conforme a éstos y a otros autores (CHOPIN et al., 1978), nuestros resultados apuntan que el medio de Baird-Parker es adecuado para verificar la contaminación estafilocócica de quesos de tipo manchego. No obstante STILES (1977) indica que tanto este medio como todos aquéllos que incluyen telurito en su composición no son adecuados para el recuento de estafilococos a partir de quesos de pasta dura. Otros autores (FITZ y OWENS, 1978; GAYA et al., 1983) aconsejan el uso de Plate Count Agar como medio no selectivo para el recuento de microorganismos no estafilocócicos.

Ya que en el recuento inicial de la leche antes de proceder a añadir ninguna sustancia biológica o química no constatamos la presencia de ninguna colonia con las características mencionadas correspondientes a estafilococos acordamos que en los recuentos realizados en los distintos momentos, todas aquellas colonias que las presentaran debían proceder de las añadidas artificialmente.

El grado de contaminación por estafilococos añadidos de forma artificial y voluntaria por nosotros (media = 30.000 UFC/ml) puede considerarse ligeramente superior a la contaminación

normal (IBRAHIM, 1978) en el caso de ser post-pasteurización, pero no ha de juzgarse elevada si los microorganismos tuvieron un origen mamético y no se sometió la leche a pasteurización o ésta fue insuficiente.

AHMED et al. (1983a) indican que la supervivencia de estafilococos añadidos en leche pasteurizada es inferior que cuando se trata de flora natural. Cuando los estafilococos proceden de vacas maméticas mueren con la pasteurización, pero si la leche no se pasteuriza, o el procesamiento es defectivo, se siguen multiplicando pudiendo alcanzar valores muy elevados (FITZ y OWENS, 1978). Los estudios epidemiológicos realizados por FITZ y OWENS (1978) en Irlanda demostraron que los estafilococos presentes en los quesos eran de origen bovino dado que eran yema de huevo negativos, poco lipolíticos y secretaban grandes cantidades de β -hemolisina. Basándose en estos caracteres no detectaron cepas de origen humano. Ya que la leche había sido sometida a pasteurización con la destrucción consiguiente y efectiva de toda la flora estafilocócica, parece probable que las probabilidades de contaminación cruzada sean bastante altas, teniendo que guardar un máximo de precauciones para separar físicamente en todos los aspectos el muelle de recogida de leche de las naves de procesamiento de la misma.

C.1. DESARROLLO DE ESTAFILOCOCCOS EN EL PROCESO DE ELABORACION

La influencia del proceso tecnológico quesero sobre el desarrollo de estafilococos se ha estudiado de forma principal en el queso de tipo Cheddar, cuyo esquema de fabricación es el que a continuación se detalla (VEISSEYRE, 1980).

Se fabrica con leche pasteurizada inoculada con 0.5 a 1% de fermento de bacterias lácticas que contiene Streptococcus lactis y Streptococcus cremoris, y en ocasiones Lactobacillus casei. La leche madura durante una hora, calentándola a continuación a 31°C. Posteriormente se añade cuajo en cantidad suficiente para que la leche coagule en 18 ó 20 minutos. Se procede a romper la cuajada hasta que quedan granos de 6-7 mm de lado que son calentados de forma gradual y progresiva hasta que se alcanza la temperatura de 37 a 39°C al cabo de media hora. Se elimina el suero a la mayor brevedad posible y la cuajada obtenida se rompe en bloques de 15 a 17 cm de grosor tras un reposo de 15 minutos. Dichos bloques son volteados cinco o seis veces manteniéndolos a 33-34°C durante dos horas. En esta operación, denominada cheddaring, se sueldan los granos de cuajada y sirve el propósito de que se produzca una progresiva acidificación de la pasta, que alcanza en el transcurso de esta fase 30 a 40 grados D. Una vez triturado se sala al 2-3 % antes de su rápida introducción en moldes. Tras un ligero prensado de media hora se recompone el queso y nuevamente se le somete a la prensa hasta el día siguiente, extrayéndolo definitivamente del molde. La maduración se lleva a cabo bien

a 5°C en un lugar seco, pudiendo prolongarse dos o tres años, o bien a 10-15°C siendo el periodo de afinado mucho más corto.

Muchos autores mencionan la importancia de que el "starter" se halle en buenas condiciones. Pero son múltiples las circunstancias que pueden hacer fracasar un cultivo láctico. IBRAHIM et al. (1981) señalan que las más importantes son la presencia de cantidades traza de antibióticos en la leche o de bacteriófagos. ZEHREN y ZEHREN (1968) detectaron un brote de esta naturaleza por tener el cultivo "starter" actividad infranormal, pudiendo demostrar que el utilizado en aquellos lotes que habían dado lugar al brote estaban contaminados por estafilococos.

Los quesos preparados con 1% de cultivo "starter" presentaban recuentos inferiores a los preparados con 0.5%, aun registrándose un valor de pH similar, siendo la diferencia de recuento de estafilococos de aproximadamente un ciclo logarítmico (KOENIG y MARTH, 1982). Cuando el "starter" falla por completo puede producirse enterotoxina estafilocócica incluso con inóculos de 5 células viables de estafilococos/ml si se permite una temperatura suficientemente alta (IBRAHIM et al., 1981).

Nuestros resultados (RQ1) indican que el efecto de la concentración del cultivo "starter" sólo se manifiesta tras 24 h después del inicio del proceso de elaboración, ya que en

las primeras tomas de muestra, hasta la introducción de la cuajada en los moldes, la diferencia entre el recuento de estafilococos en una y otra concentración de cultivo iniciador estaba sólo ligeramente desplazada a favor del más diluido. A este respecto hay que tener en mente que el proceso de elaboración del queso manchego es más rápido que el de otros tipos. Como se mencionó anteriormente las posibilidades inhibitorias de los cultivos iniciadores son múltiples pero se considera que una de las más importantes es la producción de ácido láctico a partir de la lactosa de la leche (TODD et al., 1981). Con respecto al queso manchego esta acidificación se completa mientras la pasta se encuentra prensada en los moldes, por lo que los efectos de la concentración de cultivo iniciador se manifiestan tras este momento, aunque se empiecen a vislumbrar ya en la cuajada. Excepto en la cepa 100, en los demás no se observó crecimiento sino disminución del número de estafilococos/ml de leche entre el momento de la incorporación del inóculo y la cuajada. No obstante, esto podría ser debido a una mayor pérdida de estafilococos en el suero (como se discutirá más adelante), quedando menos células atrapadas entre las micelas y no debería ser interpretado como una destrucción celular a lo largo del periodo de elaboración. Igualmente, en nuestro esquema de fabricación del queso, añadíamos la concentración deseada de la cepa de estafilococos según la cántara se calentaba en el quemador de gas butano y, debido al gran volumen de leche a calentar, se establecía un flujo en régimen turbulento que hacía que las porciones inferiores

alcanzaran temperaturas elevadas, mientras que las superiores ésta era moderada. Esto podría inducir a que los estafilococos se sometieran durante breves periodos de tiempo a choques térmicos subletales, de los que exigirían cierto periodo de tiempo para recuperarse.

AHMED et al. (1983b) indican que con un inóculo de 10^4 a 10^5 UFC/ml los recuentos en la cuajada oscilaron alrededor de 10^5 . Las cifras máximas de recuento registradas por nosotros en la cuajada han sido de 1.25×10^5 (S6-0.1%), siendo las mínimas de 8×10^3 (137-1%, 361-1% y 472-1%) estafilococos/g, muy inferiores estas últimas a las mencionadas por dichos autores. Desconocemos la técnica de elaboración del queso Domiati, por lo que no podemos emitir una hipótesis sobre las razones que motivaron que nuestros recuentos fueran inferiores.

Incluso en la cepa 100, la cuajada correspondiente al queso preparado con 0.1% presentaba menor número de estafilococos (5×10^4) que la del 1% (1×10^5). Una mala distribución del "starter" en el cultivo madre puede haber provocado este hecho. En los restantes quesos, la relación de estafilococos en la cuajada ha sido incluso de 3:1 (S6) ó 5:2 (137), aunque en los quesos 361 y 472 fuera de 2:1 (cultivo "starter" 0.1%: cultivo "starter" 1%).

AHMED et al. (1983b) obtuvieron una cifra máxima de recuento de *Staphylococcus aureus* al final del proceso de elaboración de los

quesos Domiatí (una vez prensados) de 10^7 . Este mismo resultado obtuvieron WALKER et al. (1961) quienes emplearon para la elaboración de queso Colby leche cruda procedente de mamitis subclínicas. El número de estafilococos incrementó durante el proceso de fabricación alcanzando un valor máximo en el momento de la rotura de la cuajada o en el primer día de maduración. TUCKEY et al. (1964) indicaron que en queso Cheddar los estafilococos se multiplicaban hasta la adición de sal, disminuyendo a partir de ese momento, pero registraron un pico en el día 21 de maduración que sólo pudo ser interpretado como un error en el muestreo (TODD et al., 1981). KOENIG y MARTH (1982) determinaron que *S. aureus* incrementaba tres veces en número desde el momento de la inoculación hasta el final del prensado. En las 24 h transcurridas desde la inoculación de la leche con la cepa estafilocócica y la toma de muestra del queso tras extraerlo de la solución de salmuera el número de generaciones fue siempre inferior cuando el cultivo láctico se encontraba al 1% como se aprecia en la tabla RQ10.

Estos datos corroboran lo anteriormente mencionado de las mayores posibilidades de multiplicación en un cultivo con actividad infranormal. A este respecto, IBRAHIM et al. (1981) sugieren que la práctica de almacenar queso Cheddar sin actividad "starter" a 11°C puede representar un peligro potencial. En los quesos S6, 137 y 472 dicha diferencia entre los recuentos de estafilococos registrados a cada concentración de cultivo iniciador utilizado correspondió a

un ciclo logarítmico, pero en la cepa 100, fue inferior. Ya se mencionó anteriormente que se sospechaba de una mala distribución del cultivo "starter" en el lote de leche con el que se prepararon los quesos 100, no coincidiendo el 0.1% con la décima parte de los añadidos al 1%.

Tabla RQ10: Número de generaciones registradas en los distintos quesos desde su inoculación en la leche hasta la extracción de los mismos de la solución de salmuera.

CEFA	0.1%	1%
100	4-5	2-3
S6	4-5	1-2
361	d	d
472	5-6	1-2
P		1-2

(d = recuento inferior al inicial)

C.2. DESARROLLO DE FLORA NO ESTAFILOCOCCICA EN EL PROCESO DE ELABORACION

AHMED et al. (1983b) estudiando el queso Domiati hallaron los valores de recuento de flora aerobia que exponemos a continuación comparándolos con los hallados por nosotros.

FASE	NS	5%ClNa	10%ClNa	salmuera
indóculo	5.5	5.5	5.5	6.1
cuajada	6.5	6.5	6.0	6.4
acabado	9.5	9.0	8.5	6.44

NS: queso sin sal; en las otras dos columnas se indica el porcentaje de ClNa anadido a la cuajada. Desconocemos la concentración del cultivo iniciador pero sospechamos que sea al 1%.

Los microorganismos presentes en el queso control (5×10^6) fueron superiores a los recuentos de la flora aerobia no estafilocócica en todos los demás quesos, excepción hecha del 361-1% (1×10^7). Los quesos control se elaboraron de forma conjunta con los denominados P, por lo que en el caso de no haberse producido influencias los recuentos deberían haber sido similares (en ambos casos el cultivo "starter" se incorporó a la leche en la concentración del 1%). De hecho, el recuento realizado en el momento de la adición del cultivo iniciador es idéntico en los dos lotes, pero no así los siguientes, y muy especialmente en la adición de cuajo (tabla RQ1) cuando la diferencia entre ambos fue superior a un ciclo logarítmico.

Este retraso en el crecimiento de la flora no estafilocócica en el proceso de elaboración del queso de tipo manchego (en concreto desde la incorporación del cultivo "starter" hasta la toma de muestra en la cuajada) es más acusada en los inoculados con la cepa 100 (100-1%, 100-0.1% y P). En la

bibliografía consultada no hemos hallado ningún autor que mencione un descenso de la flora "starter" hasta el momento de la incorporación de la sal. En nuestro caso pudiera ser debido a la producción de ciertas sustancias inhibitorias para los "starter" por parte de determinadas cepas, y en concreto por la 100. No obstante, como se mencionó anteriormente, el cultivo láctico del queso Cheddar, al igual que el del queso manchego, incluye Streptococcus lactis y Streptococcus cremoris, por lo que de existir un efecto antagonista entre determinadas cepas de estafilococos y algunas especies de estreptococos se debería haber manifestado también en este tipo de queso (KOENIG y MARTH, 1982; AHMED et al., 1983a), a no ser que en el queso manchego este efecto se acentúe por el efecto sinérgico que pudiera existir entre los estafilococos y alguna otra especie utilizada en el "starter". Sospechamos que la disminución en el recuento responda fundamentalmente a la acción sobre Streptococcus cremoris, componente fundamental (75-80%) del cultivo empleado por nosotros.

La bibliografía consultada es prolija en cuanto al efecto inhibitorio de determinados géneros bacterianos sobre los estafilococos, siendo éstos malos competidores (TROLLER y FRAZIER, 1960; REITER et al., 1964; IANDOLD et al., 1965; DIGIACINTO y FRAZIER, 1966; KAO y FRAZIER, 1966; MCCOY y FABER, 1966; HAINES y HARMON, 1973; WOODBURN et al., 1973; GILLILAND y SPECK, 1974; MILLER y LEDFORD, 1977), indicando que posiblemente ésta sea debida a la síntesis de

antibióticos o de sustancias filtrables, a la vez que la competición por nutrientes. Sin embargo, nunca se ha señalado que pueda existir un efecto inverso.

C.3. EVOLUCION DE LOS VALORES DE PH

Nuestros datos confirman los estudios anteriores en cuanto a que el pH sigue una evolución inversa a la del cultivo "starter" (AHMED et al., 1983b). IBRAHIM (1978) estudio el efecto del pH sobre el desarrollo de los estafilococos, añadiendo ácido láctico en un cultivo sintético que había contaminado con estafilococos. Observó que a pH de 4.87 se producía una inhibición del crecimiento de 47.41%, comenzando ésta a producirse a partir de valores de pH de 5.3. TATINI et al. (1970) denuncian que el pH de 4.5 producido por ácido láctico es bactericida para *S. aureus*. MINOR y MARTH (1972) determinaron que para ser inhibitorio el pH de los derivados lácteos debía ser de 5.0 al final de la fermentación y que para conseguir una reducción del 90% el pH final debía ser de 4.9. MAGRINI et al. (1983) controlaron el pH manteniéndolo en un valor de 6.0 durante la incubación a 30°C.

Acometimos el estudio de mantener el pH en valores cercanos a la neutralidad para estudiar el efecto que éste ejercía sobre el desarrollo de la microflora presente en el queso manchego. A tal fin procedimos a sustituir el suero obtenido tras la

ruptura de la cuajada por un tampón fosfato concentrado (0.5M) permitiendo una interacción entre éste y los granos de cuajada durante cierto tiempo, hasta que consideramos que se había producido la estabilidad de las cargas electrostáticas, tal y como se describió en el apartado correspondiente (B.3.1.a. del capítulo I). Los efectos de esta sustitución son difíciles de evaluar. De hecho sólo se pudo observar un valor de pH elevado en el suero y en la cuajada (6.7 y 6.9, respectivamente), ya que inmediatamente después de extraer el queso del molde era similar al del resto de los lotes. Tras eliminar el tampón e introducir la pasta en el molde el recuento de estafilococos había descendido de forma notable, probablemente como consecuencia del lavado acaecido, ya que se pudo constatar que la pasta tenía una consistencia diferente de los otros lotes, siendo más quebradiza. Durante las 18-20 h que los quesos permanecieron prensados e introducidos en la solución de salmuera se desarrollaron 7 u 8 generaciones de estafilococos, probablemente estimuladas por los valores de pH elevados, de tal forma que los recuentos en la primera toma de muestra arrojaban cifras muy similares a las obtenidas en otros quesos. Por el contrario, en este mismo intervalo de tiempo sólo se desarrollaron 1 ó 2 generaciones de flora no estafilocócica, en concentración similar a otros quesos antes de ser introducida en los moldes. Por lo tanto, se puede deducir que un pH elevado, aun no afectando la flora láctica, permite un desarrollo máximo de los estafilococos.

El pH mínimo registrado por nosotros en la primera toma de queso ha sido 5.2 (E-0.1%) y el máximo 5.5 (100, 137, 361-0.1%, C, E-1%) (tabla RQ4) por lo tanto no se han llegado a los valores mencionados. Conforme a lo descrito por KOENIG y MARTH (1982), el pH final alcanzado fue idéntico para una misma cepa en los quesos fermentados con 1 y con 0.1% de cultivo "starter", a excepción de 361 y de E. El pH en la primera toma de muestra control fue de 5.5. Por otra parte, no han coincidido con aquellos quesos donde se registró un mayor crecimiento de "starter".

C.4. VALORES DE DNAsa Y TNAsa OBTENIDOS

Nuestros resultados sugieren la presencia de actividad DNAsa en el cuajo, ya que los recuentos de estafilococos en el momento de adicionar dicho compuesto no justifican una reacción positiva en las placas de agar azul de toluidina (tabla RQ5). En una primera experiencia para comprobar dicho efecto, realizando varias diluciones del cuajo en leche se pudo constatar que una concentración superior implicaba un halo de diámetro mayor. No obstante, las experiencias posteriores con cuajos de otras marcas, procedentes de cuajares de terneros, no resultaron concluyentes. Las propiedades parecían fluctuantes, ya que en algunos casos, la actividad DNAsa fue muy importante (S6), mientras que en el lote P no mostró ser termorresistente. La bibliografía consultada sólo deja atisbar el trabajo de IBRAHIM (1978)

quien señala haber detectado TNAsa sin la existencia conjunta de un número de estafilococos suficiente. No indica haber examinado el cuajo para comprobar si dicho efecto podía provenir del mismo.

La evidenciación de DNAsa como sustituto de la detección de enterotoxinas presentes ha gozado de adeptos y de detractores. Consideramos que si una de las enzimas del cuajar de los rumiantes jóvenes (especialmente, corderos) tiene capacidad de desdoblar el DNA y se mantiene a lo largo del procesamiento del mismo, podría hacer incurrir en resultados falsos positivos, con los inconvenientes que eso conllevaría. El procedimiento más general para obtener el cuajo consiste en lavar sucesivamente los cuajares, haciendo pasar el líquido a través de baterías de cubas en las que se han dispuesto cuajos progresivamente menos agotados. El cuajo en polvo se obtiene precipitando el enzima por saturación de la solución con cloruro sódico.

Otra explicación alternativa a la actividad TNAsa del cuajo sería que durante el proceso de elaboración, se hubiera contaminado ese lote concreto de forma masiva con estafilococos, teniendo éstos la posibilidad de secretar desoxirribonucleasas. Según este supuesto también habrían podido secretar enterotoxinas que habrían perdurado a lo largo del proceso de maduración, habiéndose detectado en el queso control mediante las pruebas específicas. Este supuesto no puede ser descartado definitivamente, ya que si bien en

los quesos control no se pudo detectar la presencia de enterotoxinas, no se excluye la probabilidad de que fueran la enterotoxina estafilocócica E, ó la F ó incluso alguna todavía no identificada. Igualmente, se pudo producir desoxirribonucleasa pero no enterotoxina. Sugerimos que es importante comprobar la actividad DNAsa del cuajo antes de afirmar que un queso es positivo a este enzima.

NISKANEN y NURMI (1976) indican que valores de recuento iguales a 10^5 son suficientes para que se pueda detectar TNAsa en los alimentos, pero SANTOS y GENIGEORGIS (1981), al igual que KOUPAL y DEIBEL (1978) no pudieron detectar TNAsa presente en las muestras de queso con valores de recuento inferiores a 10^7 . No todas las cepas de estafilococos sintetizan niveles idénticos de DNAsa (ERICKSON y DEIBEL, 1973; EMSWILLER-ROSE y JOHNSTON, 1980) y se ha puesto de manifiesto la ausencia de relación entre el crecimiento y la cantidad de enzima secretado (IBRAHIM, 1981).

Se ha comunicado la presencia de TNAsa en ausencia de enterotoxina estafilocócica. SCHOUWENBURG et al. (1978) analizaron la formación de TNAsa en queso Gouda siendo ésta detectada cuando los valores de recuento de *Staphylococcus* oscilaban entre 10^6 y 10^7 células/g, pudiéndose detectar antes que la presencia de enterotoxinas estafilocócicas. AHMED et al. (1983b) no pudieron detectar enterotoxina A presente (producida por la cepa 100) aun cuando era evidente la síntesis de TNAsa y el recuento estafilocócico era

elevado.

La presencia de enterotoxina en ausencia de DNAsa termoestable ha sido denunciada en varias ocasiones. ERICKSON y DEIBEL (1973) indican que la síntesis de TNAsa pudiera estar reprimida por tensiones bajas de oxígeno y por un pH ácido, aunque FOX y HOLMAN (1968) mantienen que el enzima se produce tanto en ausencia como en presencia de oxígeno. La anaerobiosis afecta al pH final y a este respecto señalaron ERICKSON y DEIBEL (1973) que el pH óptimo para la producción de DNAsa estafilocócica es de 8.3. La glucosa influye en el valor final de pH, por lo que se puede inhibir al metabolizarse dicho azúcar reductor. TODD et al. (1981) indicaron que no todas las muestras con enterotoxinas estafilocócicas presentaban también actividad TNAsa y sugirieron como explicación la inactivación de la misma por enzimas proteolíticas (DONNELLY et al., 1968; LACHICA et al., 1972) o la producción de EET sin TNAsa (LEE et al., 1975). Ya que es un enzima calcio-dependiente, su acción puede ser suprimida por quelación de este elemento (ERICKSON y DEIBEL, 1973). BOUWER-HERZBERGER et al. (1981) informaron acerca de la ausencia de TNAsa en alimentos causantes de un brote de intoxicación estafilocócica, aun cuando de forma empírica en cultivo la cepa aislada del alimento (en donde se encontraba en números elevados) producía tanto TNAsa como enterotoxina. Al contaminar natillas de forma artificial tampoco pudieron apreciar la presencia de dicho enzima. No obstante, por irradiación se han obtenido mutantes TNAsa negativos, que a

la vez eran coagulasa, lecitinasa y enterotoxina negativos, recuperándose las cuatro características (fotoreactivación) en determinadas condiciones, motivando la sospecha de la existencia de mecanismos coordinados de síntesis (BATISH et al., 1981).

KOUPAL y DEIBEL (1978) y EMSWILLER-ROSE y JOHNSTON (1980) denunciaron los problemas planteados por los resultados dudosos, ya que varias de sus muestras adquirían una tonalidad azul clara o incolora, o el color rosa era difuso. Aunque en nuestros resultados no venga así expresado, hemos considerado que aquellos diámetros de 0.6 ó 0.7 cm tienen carácter dudoso. IBRAHIM (1981), aplicando la misma técnica que hemos seguido nosotros para la detección de TNAsa informó que se podía observar una pequeña zona de actividad desoxirribonucleasa en muestras donde se encontraban menos de 100 *Staphylococcus aureus* /g de queso presentes, así como en los quesos control. Esto fue interpretado por dicho autor como que otros microorganismos distintos de estafilococos también podían producir el enzima. LACHICA et al. (1972) también indicaron haber detectado TNAsa producida por otros microorganismos, en concreto *Bacillus subtilis* y *Streptococcus fecalis* var. liquefaciens. Este resultado concordaba con los de THOMAS y NAMBU DRIPAD (1974) quienes observaron que 30 cepas de *Streptococcus fecalis* de las 125 estudiadas producían TNAsa. BATISH et al. (1984a) y BISSONNETTI et al., (1980) estudiaron derivados lácteos y observaron que tanto *Streptococcus faecalis* var. zymogenes, *Bacillus cereus* y en general

hongos, eran capaces de producir enzimas que desdoblaban el DNA. De igual forma, la capacidad DNAsa termoestable en estreptococos de los grupos A, B, C, F, G y L ha sido puesta de manifiesto por GUDDING (1979), y del grupo D por THOMAS y NAMUDRIPAD (1974) y por BATISH et al. (1982).

Por lo tanto, la poca especificidad de la prueba se ha puesto de manifiesto en múltiples ocasiones, y se corrobora por los resultados obtenidos por nosotros. No obstante, se ha indicado que este inconveniente disminuye al variar las características de la prueba, por la incubación del agar azul de toluidina durante cuatro horas a 50°C. Así mismo, TATINI et al. (1976) y BATISH et al. (1984a) indican que la DNAsa de Staphylococcus aureus es activa a pH 9.0, mientras que otras requieren valores inferiores de pH para mostrar su actividad. En nuestro estudio, recogimos estas sugerencias, pero no favorecieron la anulación de los resultados falsos negativos.

Al comparar los distintos procesos de extracción de la DNAsa propuestos por los diferentes autores constatamos que siguiendo el sugerido por IBRAHIM y BALDOCK (1981) no se obtenían los resultados óptimos, amén de ser laborioso y no poderse realizar con un número elevado de muestras. El propuesto por IBRAHIM (1981) reunía las ventajas de ser rápido y sencillo, funcionando bien con los otros alimentos, especialmente con la leche condensada.

En varias muestras fue superior el valor registrado para la actividad TNasa que para la DNasa. Tampoco hemos encontrado ninguna referencia sobre este tema pero dicho resultado podría deberse a que con el calentamiento se liberen ácidos grasos volátiles o se fundieran grasas que inactivaran el enzima, bien por razones físicas, impidiendo su actuación, o bien por razones químicas, por la presencia de enlaces.

BARVE y KULKARNI (1984) señalaron que la detección de TNasa no se afecta por la presencia de sal, glucosa o manitol. La glucosa influye en el valor final del pH.

Se ha señalado que la TNasa es más termorresistente que la enterotoxina A ya que no se inactiva tras 105 minutos a 100°C, 50 minutos a 110°C ó 20 minutos a 121°C, mientras que la EEA sí. No hemos comprobado el porcentaje de recuperación de desoxirribonucleasa a partir de quesos, pero IBRAHIM y BALDOCK (1981) mencionan que es del $57 \pm 18\%$ para este alimento.

Las características bioquímicas de la molécula de DNasa estafilocócica son muy similares a las de las enterotoxinas. Ambas son moléculas proteicas, constituidas por una cadena polipeptídica única, con estructura terciaria globular. La primera está constituida por 149 aminoácidos, siendo su peso molecular de 16.807 D (LACHICA et al., 1972). Estas características justifican que la enterotoxina que añadimos a la leche (denominada "cruda"), estuviera contaminada con

moléculas de DNAsa, ya que el proceso de purificación probablemente incluiría a lo sumo la cromatografía con resinas de exclusión molecular. En la tabla RQ7 se puede apreciar, que si bien la concentración de DNAsa en la leche al añadir la toxina era elevada (diámetro = 1.2-1.3 cm), la detección de ésta sufrió una disminución con el tiempo, adquiriendo valores muy bajos a las tres o cuatro semanas de haber preparado el queso. Curiosamente este hecho coincidió en el tiempo con aquellos momentos en que se registró una menor cantidad de enterotoxina (tabla RQ9). En un principio estos datos sugerían la presencia de alguna sustancia con actividad proteolítica. Sin embargo, dichas sustancias volvieron a detectarse en mayor concentración a partir de los días 32-35 aunque los recuentos periódicos no evidenciaban la contaminación indeseada por estafilococos coagulasa positivo. Así mismo, tampoco las variaciones en el número de microorganismos aerobios totales, ni en el pH pueden imputarse como responsables directos de estas fluctuaciones. Tanto las enterotoxinas como la TNAsa son proteínas muy estables, como se mencionó anteriormente. Se sugiere la posibilidad de que se liberen al medio con carácter aditivo sustancias que al conjugarse con las proteínas impidan su detección (aunque desconocemos si bloquearían su actividad biológica "in vivo"), pero que llegado un momento dado y por depleción de ciertos elementos sean reutilizadas, liberándose la actividad de las proteínas para poder detectarse de nuevo. Este hecho no había sido puesto de manifiesto en la bibliografía consultada, y creemos merece un estudio aparte

detenido.

C.5. PERDIDAS DE ESTAFILOCOCCOS EN EL SUERO

Uno de los objetivos impuesto por nosotros era establecer si durante la coagulación de la leche se producía multiplicación de las células presentes. Los estafilococos parece que incluso se destruyen parcialmente. En los quesos 100-1%, S6-0.1% y 361-0.1% lo recuperado tras romper la cuajada representó el 80% de los estafilococos presentes en el momento de la adición del cuajo, pero en los 100-0.1% y 361 fue el 30 y 35%, respectivamente, mientras que en S6-1% el 66%. De estas cifras se deduce que durante el periodo en el que se coagula la leche por acción del cuajo no se permite la multiplicación de las células estafilocócicas. La variabilidad entre los valores de las pérdidas podría obedecer a la distribución del cuajo en la leche o a que se permitiera una actuación superior de éste, dado lo subjetivo de la apreciación del momento de cortar la cuajada.

Por el contrario, en la flora no estafilocócica se observó que el recuento era superior (cuajada + suero) en 100-0.1%, S6-0.1% y P, siendo en 361-0.1% ligeramente superior. Por el contrario, en 100-1%, S6-1%, 361-1% y C la recuperación fue del 50 al 60%. Al igual que antes, esta variabilidad pudiera responder a un efecto de la técnica, pero también se aprecia que cuando la concentración del cultivo "starter" es del 0.1%

hay un grado superior de multiplicación. Podría inculparse de esta multiplicación al consumo de lactosa, aunque no se refleje en valores inferiores de pH.

AHMED et al. (1983a) estudian el suero de queso Domiati (egipcio) en cuanto a su capacidad para sustentar el crecimiento de estafilococos. KOENIG y MARTH (1982) determinaron que se eliminaban muy pocas células en el suero; READ y BRADSHAW (1965) analizaron la distribución en el suero y en la cuajada; observaron que en esta última se recuperaba el 92% de los estafilococos añadidos. Nuestros datos indican que las pérdidas de estafilococos en el suero representan en ocasiones el 5% (56-1%), mientras que en otros fueron superiores al 50% (361). En aquellos quesos donde se detectó la presencia de enterotoxinas, las pérdidas en el suero no fueron muy elevadas. La explicación de este fenómeno puede deberse, como ya se indicó anteriormente, al hecho de que la cuajada no se cortara siempre en el mismo instante, pudiendo en ciertos momentos ser incompleta por lo que las células microbianas no habrían quedado totalmente atrapadas en las micelas de caseinato cálcico.

C.6. DIFERENCIAS DE RECUENTOS EN LAS PRIMERAS 24 h (SALAZONADO)

Varios autores ponen de manifiesto la importancia del salazonado de los quesos, indicando que sería preferible

suprimir dicha práctica. Al ser los estafilococos microorganismos halotolerantes y poder multiplicarse en concentraciones de ClNa disgenésicas para otras bacterias se desarrollarían con mayores posibilidades de supervivencia en quesos salados. Por lo tanto, el efecto de control sobre los estafilococos que ejerce la flora láctica añadida se ve seriamente disminuido. AHMED et al. (1983a) y MINOR y MARTH (1972) indican el efecto sinérgico entre el valor de pH y el ClNa, manifestando que la sal parece ser inhibitoria para el crecimiento de estafilococos en niveles bajos de pH. Cuando se acompaña de un valor de pH adecuado la sal puede retardar el crecimiento de *S. aureus*, reduciendo su supervivencia, aunque IBRAHIM (1978) haya señalado que la inhibición sobre los estafilococos no es muy notable hasta que no se alcanza la concentración del 5%. IBRAHIM et al. (1981) determinaron que tras seis semanas el pH de los quesos Cheddar salados era de 6.2, mientras que el de los no salados era de 5.42, infiriendo que la presencia de ClNa frenaba el desarrollo de la flora láctica en este tipo de quesos. Posiblemente por esta circunstancia diversos autores hayan registrado menor cantidad de EEA en los quesos no salados que en los salados (IBRAHIM et al., 1981; KOENIG y MARTH, 1982). Por otros lado, KHALID y HARRIGAN (1984) han señalado que en queso sudanés no parece posible la producción de enterotoxinas por los estafilococos, una vez se ha adicionado la sal y ha comenzado el proceso de la coagulación de la leche, incluso en aquellas circunstancias en las que la flora láctica no se desarrolla.

Los datos de AHMED et al. (1983a) indican que en el suero sin sal la pérdida de viabilidad de *S. aureus* tras 6 h a 30°C es manifiesta y drástica, pero cuando hay sal disminuye lentamente.

KDENIG y MARTH (1982) estudiaron el efecto de los iones Cl^- y Na^+ en queso Cheddar. Cuando se añadía a la cuajada una mezcla de ClNa y ClK se registraron menor número de microorganismos que cuando se añadió sólo ClNa . No obstante la cantidad de enterotoxina A secretada (cuantificada por el método RIA) parecía no estar relacionado con la sal. Los niveles de enterotoxina hallados por dichos autores (0.05-0.52 ng/g de queso) son semejantes a nuestros resultados.

La tecnología del queso manchego lleva siempre implícita la inmersión en una solución de salmuera a fin de estimular una desecación superior en la periferia del queso, y elaborar piezas con corteza. Se acelera así el proceso de deshidratación, no sólo por el efecto de diálisis sino también por la contracción de las proteínas derivada de la disminución de su grado de hidratación. Durante esta fase se modifica el reparto de las sustancias minerales, abandonando el Ca la pasta, mientras que el sodio de la salmuera y el potasio de la pasta tienden a acumularse en el corazón del queso (VEISSEYRE, 1980).

Nuestro objetivo ha sido atenernos a la tecnología industrial del queso manchego en la medida de lo posible, por lo que decidimos mantener la práctica del salazonado. No obstante, a fin de evaluar los efectos de la relación volumen : superficie, así como del grado de penetrabilidad de la sal, planteamos el preparar quesos de dos tamaños diferentes para cada cepa y concentración de cultivo iniciador. En el queso manchego durante el periodo que se mantiene en salmuera la sal penetra unos 2 cm hacia el interior, (LIZARRALDE, comunicación personal), estableciéndose en los días sucesivos un gradiente hasta que se igualan las concentraciones. Este supuesto no quedó confirmado, ya que por el tratamiento estadístico, la media de los logaritmos de los quesos grandes y pequeños no fue estadísticamente diferente. Procedimos a establecer si la relación entre flora láctica y flora estafilocócica entre los dos tamaños de quesos adquiría diferencias significativas, con el ánimo de determinar si podría ser afectada por la salinidad superior y una tensión de O_2 . El tratamiento estadístico negó este supuesto, resultando de nuevo en una diferencia no significativa. Probablemente la diferencia de tamaño entre uno y otro queso no fuera suficiente como para demostrar un efecto notable. Las características aproximadas de los quesos preparados en uno y otros molde se exponen a continuación.

	PEQUEÑO	GRANDE
PESO	800±25 g	1250±100 g
SUPERFICIE	592.5 cm ²	954.4 cm ²
VOLUMEN	cm ³	cm ³

Varios autores ponen de manifiesto las diferencias de estafilococos entre el interior y el exterior de los quesos. Así, TUCKEY et al. (1964) expusieron que en el interior de los quesos Limburger había menos *Staphylococcus aureus* aunque la sal tuviera menor acceso, y se encontraran en la superficie presentes *Brevibacterium linens* y hongos, que serían inhibitorios para los estafilococos. TODD et al. (1981) sugieren que en el centro del queso se mantiene la temperatura de 25-30°C durante mayor tiempo, puesto que las pérdidas calóricas son inferiores; por lo tanto, el desarrollo de la flora láctica se prolongaría más que en la periferia, inhibiendo el desarrollo de los estafilococos. Según esta hipótesis, los quesos pequeños mostrarían un recuento superior de estafilococos. Nuestros datos no confirman esta teoría, ya que, como hemos señalado, los recuentos en ambos tamaños son muy similares.

BARBER y DEISEL (1972) pusieron de manifiesto que se producía mayor crecimiento y síntesis de enterotoxina en la periferia de los embutidos, donde la tensión de oxígeno era superior, que en el interior. KUSCHFELDT (1980) realizó un estudio sobre la influencia del tamaño de embutidos tipo salchicha inculpadas en casos de intoxicación, concluyendo que las salchichas gruesas, en las que el pH era de 5.5, habían sido incriminadas en mayor número de ocasiones que las finas (con pH 5.3).

C.7. PERIODO DE MADURACION

C.7.1. EVOLUCION DE LOS ESTAFILOCOCOS

MONTANARO et al. (1978) estudiaron el crecimiento de los estafilococos en el queso mozzarella pudiendo computar más de 10^8 células de *S. aureus* tras 48 h de su incorporación a la leche. Nuestros resultados no concuerdan con los enunciados por dichos autores, ya que en ningún momento se alcanzó la cifra expresada, y no se obtuvieron los valores máximos en tan corto periodo de tiempo. Tal y como se expresa en la tabla RQ6, el recuento máximo se obtuvo en espacios de tiempo diferentes, siendo la media de 21 días, oscilando los valores máximos obtenidos entre 10^6 y 10^7 . Este retraso con respecto a los valores indicados por MONTANARO et al. pudieran atribuirse a la disminución del ritmo de crecimiento (TROLLER, 1976) que sufren los microorganismos al ser incubados en condiciones de pH bajo y a temperaturas de 10-15° C.

FITZ y OWENS (1978) indicaron que después de 10 semanas de maduración no se recuperaron estafilococos en queso Cheddar, si bien KOENIG y MARTIN (1982) determinaron que tras ocho semanas de almacenamiento a 10° y a 4 °C, la flora estafilocócica había decaído sólo 0.5 ciclos logarítmicos con respecto a la cantidad inicial. AHMED et al. (1983b) observaron que en queso Domiatí se detectaban estafilococos

con capacidad vital hasta la cuarta semana, aunque la temperatura de almacenamiento fue a 30°C. Nuestros resultados indican que entre los días 35 y 42 se produce una disminución drástica del número de estafilococos, habiendo desaparecido de gran parte de los quesos en el día 58 (último estudiado). En los tres quesos que en esta fecha todavía fue posible detectar estafilococos (100-0.1%, 100-1% y 472-0.1%) se evidenció la presencia de enterotoxina; pero en otros no se evidenciaron estafilococos pero sí enterotoxina. Estas discrepancias entre los resultados pudieran obedecer a las diferentes temperaturas de almacenamiento, siendo más activo el metabolismo a temperatura de 15°C, que a 4 ó a 10°C, por lo que bien la liberación al medio de factores limitantes o bien el consumo de ciertas sustancias imprescindibles para el desarrollo de los estafilococos se produciría de forma más precoz.

C.7.2. EVOLUCION DEL pH

GAYA et al. (1983) inocularon con microorganismos coliformes, enterobacteriáceas y estreptococos fecales leche para la elaboración de quesos de tipo manchego, registrando el valor mínimo de pH el día 2, a partir del cual fue subiendo. Nuestros resultados no concuerdan con los obtenidos por dichos autores, pero esto es explicable en base a que estos microorganismos muestran un metabolismo caracterizado por la liberación de iones con actividad basificante.

LIZARRALDE (comunicación personal) señala que en los quesos tipo manchego fabricados de forma industrial el pH inicial experimenta un descenso, pudiendo alcanzar el valor de 5.0. Al final del periodo de maduración, transcurridos dos meses, no obstante se debe registrar un valor de 5.1-5.3. Según estos datos, nuestros resultados concuerdan en su mayoría con los expresados, si bien en algunos casos, el valor de pH disminuyó por debajo de 5.0. En cuatro quesos (100-1%, S6-0.1%, S6-1% y 137-1%) el pH registrado el último día de maduración (día 58) fue superior a 5.5. Este alza podría obedecer a: 1) muerte celular, con liberación de sustancias aminadas; 2) factores tecnológicos, ya que los quesos habían sido sometidos a múltiples tomas de muestra, y su tamaño había quedado muy reducido por el proceso de extracción y análisis de enterotoxinas; esta alteración en las condiciones físicas podría determinar una combinación de los hidrogeniones con ciertas sustancias, por lo que el valor final de pH sería superior.

C.7.3. SINTESIS DE ENTEROTOXINAS

Dos hechos llaman la atención en nuestros resultados. Por una parte, la producción de enterotoxinas a temperaturas de maduración (15° C): por otra la falta de síntesis de enterotoxina B por la cepa S6, aun habiendo secretado concentraciones elevadas de enterotoxina A.

En cuanto a la primera cuestión, IBRAHIM y BALDOCK (1981) indicaron que no hay correlación alguna entre el crecimiento y la producción de enterotoxina. Se deduce una observación similar a la vista de las figuras R01 a 13, ya que un mayor crecimiento no trajo consigo una concentración superior de enterotoxina, ni siquiera al considerar la misma cepa y la misma concentración de cultivo iniciador. Si bien las concentraciones de enterotoxina detectada experimentaron variaciones en el transcurso de la maduración, nunca dejaron de observarse estas proteínas si ya se habían detectado anteriormente, indicando que no se destruyen a lo largo del periodo de afinado. Las oscilaciones en la concentración ya se discutió en el apartado C.4. de este mismo capítulo. Según READ y BRADSHAW (1965) la cantidad de enterotoxina permanece estable durante el periodo de maduración.

Nuestra observación acerca de la falta de síntesis de EEB coincide con las de varios autores. BENNETT y AMOS (1983) inocularon queso ya fabricado con dos cepas enterotoxigénicas, una de ellas de enterotoxinas A, B y E y la otra de C y D. Pudieron detectar todas las enterotoxinas excepto la B. El almacenamiento fue a 26°C y se pudo constatar la presencia de enterotoxina ya en el día cuarto, con cifras de recuento de 3×10^6 . Observaron que existían variaciones de producción en diferentes quesos, coincidiendo con lo mencionado anteriormente. HEIDELBAUER (1973) indicó que la EEB no se producía a valores de pH inferiores o

iguales a 5.5. Por lo general parece ser que las condiciones de síntesis de EEB son mas limitantes que para la EEA, lo que podría explicar en parte que no se hubiera detectado esta enterotoxina en el queso.

Se ha señalado (SUAREZ y OVEJERO, 1976) que los mecanismos de síntesis de EEB y EEA son diferentes. Así, mientras las formas L de las cepas productoras de EEA sintetizan toxina, no lo hacen las de EEB. La conclusión de este hecho es que la EEB está relacionada con la superficie celular (posiblemente con la pared) a diferencia de la EEA. La enterotoxina A es un metabolito primario, secretado en la fase exponencial, mientras que la B lo es secundario, secretado en la fase estacionaria. La EEB es muy sensible a los aditivos, condimentos y sustancias conservantes (FRIEDMAN, 1968). Así mismo, NOTERMANS y HEUVELMAN (1963) indicaron que la EEA se producía siempre que hay crecimiento, mientras que la EEB es afectada por la actividad de agua.

SUGIYAMA et al. (1960) como MARKUS y SILVERMAN (1970) indican que hay pocos casos de intoxicación por EEB. MAGRINI et al. (1983) estudiaron el efecto de la actividad de agua de los quesos sobre el desarrollo de *Staphylococcus aureus* y la producción de enterotoxina, ajustando dicho parámetro a 0.993, 0.97 y 0.95 con cloruro sódico, pero cuando se utilizó salmuera disminuyó la cantidad de enterotoxina a la mitad.

Llevamos a cabo el primer análisis para la detección de

enterotoxina estafilocócica en el día 24 de maduración. En esta fecha, y aunque en cantidades variables se detectó enterotoxina presente en 6 de los quesos (100-0.1%, 100-1%, 56-0.1%, 56-1%, 472-0.1% y P), exactamente los mismos que al finalizar la maduración. Dado que nuestro interés inicial había sido determinar qué quesos eran potencialmente tóxicos una vez listos para su consumo, no consideramos necesario realizar detecciones anteriores a la fecha indicada, por lo que carecemos de datos para comparar con los de otros autores. Al final del proceso de cheddaring, IBRAHIM et al. (1981) no detectaron EEA presente en la pasta, pero sí que pudieron registrarla ya tras el prensado, encontrando relación entre los valores de recuento y la cantidad de enterotoxina secretada (la maduración fue a 11°C). MONTANARO et al. (1978) estudiaron la producción de enterotoxina mediante el método del microporta en queso mozzarella inoculado con 10^5 , 10^6 y 10^7 *S. aureus* /g de queso y sometiendo el queso a 18 ó 20 °C durante el periodo de maduración. Detectaron la presencia de EEA en cantidades que oscilaban entre 0.01 y 0.1 µg/g de queso cuando las cifras de recuento alcanzaron 28×10^7 UFC/g, tras 48 h de la inoculación. La producción de EEB fue mucho más precoz, ya que pudieron registrar dicha enterotoxina a las 24 h con unos niveles de recuento de 9×10^7 *S. aureus* /g. Afirmaron así mismo, que 10^5 células de *S. aureus* eran insuficientes para producir enterotoxina en cantidades detectables en 24 h a 18° C.

SCHOUWENBURG et al. (1978) indujeron un fallo del "starter" observando que tras 24 h de maduración del queso Gouda el número de estafilococos presente era de 4.1×10^6 , nivel que había sido suficiente para secretar 0.2 - 0.3 µg EEB/g y 0.14 µg TNAsa/g. En otra cepa, tras el mismo periodo de tiempo, se registraron 2.9×10^6 células de *Staphylococcus aureus* /g siendo las cantidades de EEC y de TNAsa por gramo de 0.05 - 0.2 µg y 0.05 µg, respectivamente. Sugieren que la actividad TNAsa debe ser un dato cualitativo, ya que se sospecha que la producción de esta enzima sea diferente en las distintas cepas. NISKANEN y NURMI (1976) analizando el efecto del cultivo iniciador en la producción de enterotoxinas y de DNAsa termoestable en embutidos demostraron que en ausencia del cultivo láctico se podían detectar cantidades mensurables de enterotoxina A tras tres días, con un recuento de 10^6 células/g. No pudieron detectar enterotoxina B aunque el número total de estafilococos rebasó 10^8 células/g. La presencia de enterotoxina C1 se evidenció cuando el recuento de *Staphylococcus* fue de 8×10^7 células/g, desapareciendo tras siete días. El cultivo iniciador impidió la presencia de EEA en todos los casos investigados, pero no de C1. Se observó la presencia de TNAsa en todos los casos en los que se habían añadido estafilococos productores de enterotoxina, pero no se demostró una correlación entre la actividad termonucleasa y el recuento.

El número mínimo de estafilococos que hemos registrado que era capaz de sintetizar enterotoxinas en cantidades

mensurables ha sido de 3.1×10^5 (P), si bien ésto ha sido un hecho excepcional, puesto que los valores han oscilado generalmente entre 8.5×10^5 y 1×10^6 . Estos datos son inferiores a los señalados y pudieran obedecer a la sensibilidad de la técnica de detección y a que la muestra se concentró aproximadamente 10 veces.

CAPITULO III:

MAYONESA

A. INTRODUCCION

A.1. MAYONESA

A.2. BROTES EN LOS QUE HAN SIDO INCULPADOS ALIMENTOS CON
MAYONESA

A.3. ORIGEN DE LA CONTAMINACION

A.4. FACTORES QUE CONTROLAN EL CRECIMIENTO

A.1. MAYONESA

El Código Alimentario Español define las "salsas" como "la composición o mezcla de varias sustancias comestibles y que sometidas al tratamiento culinario conveniente se utiliza para acompañar a la comida o a los preparados alimenticios. En concreto, la salsa mayonesa es la emulsión espesa formada básicamente por aceites vegetales alimenticios, huevos o yemas de huevo y vinagre o zumo de limón. Podrá contener agua, sal, azúcar o glucosa, féculas alimenticias, ácidos cítrico, tartárico o láctico y especias, con excepción de azafrán. El producto terminado y dispuesto para el consumo, ya sea envasado o elaborado en los restaurantes, no tendrá menos del 25 por 100 de extracto etéreo. Deberá declararse la presencia de féculas cuando sobrepase el 0.5 %.

Las características físico-químicas serán:

Extracto etéreo (con éter etílico): 65 por 100 mínimo.

Acidez: 0.2 por 100 mínimo en ácido acético.

pH: inferior a 4.2

Contenido en huevo: 5 por 100 mínimo expresado en yema de huevo técnica (contenido mínimo en materia seca referido a yema no preservada, de 42 por 100) "

A.2. BROTES EN LOS QUE HAN SIDO INCULPADOS ALIMENTOS CON MAYONESA

El Centre for Disease Control (MORITA y WOODBURN, 1983) informa que en el periodo transcurrido de 1969 a 1979 las ensaladas de pollo fueron responsables de 16 brotes (1.935 casos), las de huevo de 9 brotes (348 casos), las de patata y macarrones de 27 brotes (1.887 casos) y las salsas de mesa, de dos brotes (11 casos). METZEL et al. (1978) denunciaron que, tras comer una ensalada de huevo, 40 personas en 16 aldeas diferentes y pueblos de un distrito mostraron los síntomas típicos de intoxicación estafilocócica, aislándose estafilococos coagulasa positivos productores de enterotoxina A de las materias primas de la ensalada de huevo y de la propia ensalada, de los pacientes y de uno de los empleados de la cocina.

El Boletín Epidemiológico Semanal de la Dirección General de

Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo recoge en sus últimas ediciones (1980, 1981, 1982, 1983, 1984) una serie de brotes que han tenido lugar en nuestra geografía: así, en 1980 se denunció un brote masivo, que afectó a 103 personas por la ingestión de ensaladilla de donde se aislaron estafilococos patógenos; en 1981, 13 personas sufrieron síntomas igualmente por la ingestión de ensaladilla; en 1982 fueron 180 los comensales de un banquete (de los que 37 requirieron hospitalización) quienes resultaron afectados por intoxicación estafilocócica igualmente por ensaladilla rusa, que había sido preparada con anterioridad y conservada sin refrigerar a temperatura ambiente. Finalmente, en 1984 se afectaron 6 personas por ingerir ensaladilla preparada el día anterior a su consumo y conservada a temperatura ambiente.

A.3. ORIGEN DE LA CONTAMINACION

En España, pese a que la ley lo prohíbe (B.O.E. del 11 de noviembre de 1983 "La elaboración y manipulación de mahonesas, salsas, cremas y natas se efectuará con la mínima antelación y serán consumidas dentro de las veinticuatro horas, manteniéndose constantemente en refrigeración") es costumbre en algunos locales (bares, cafeterías) preparar las ensaladillas y mantenerlas sin refrigerar, bajo el cristal protector del mostrador durante varias horas, hasta su consumo. Esta práctica se mantiene por el hábito de exhibir los productos, convirtiéndolos en cebo y reclamo. Sin

embargo, ésto representa un riesgo potencial para el consumidor pues la temperatura en dichos locales puede elevarse en ocasiones a más de 30 °C, y como indicaran NOTERMANS y HEUVELMAN (1983), el pH del producto puede incrementarse a valores elevados, por la adición de otros componentes, permitiendo el desarrollo de los estafilococos.

Así mismo, es frecuente incluir ensaladilla o cualquier otro alimento acompañado de mayonesa en la fiambarrera, tanto de escolares como de trabajadores, obligados a comer en sus lugares de trabajo. Dependiendo de los casos, en estas circunstancias el alimento puede permanecer sin refrigerar durante seis horas o más, convirtiéndose en un vehículo potencial de enterotoxinas.

Una posibilidad extrema la representaría la mayonesa ingerida en el propio hogar, en aquellos casos en que o bien se prepare comida para dos días, permaneciendo sin refrigerar en el intervalo de tiempo, o bien cuando una vez preparada la mayonesa y por la elaboración de un plato que exija una preparación prolongada, se deje a temperatura ambiente.

A.4. FACTORES QUE CONTROLAN EL CRECIMIENTO

HEWITT (1957) indicó que las condiciones desfavorables de pH inducen efectos bacteriostáticos, que al cesar el metabolismo y la multiplicación se prolongan hasta ser bactericidas.

La acidez de un alimento es un determinante importante del potencial del crecimiento microbiano. Afecta a la fase de latencia, y al ritmo de crecimiento de los microorganismos en los valores extremos.

Los productos ácidos, según MINOR y MARTH (1972a) no son susceptibles de ser sospechosos de intoxicaciones estafilocócicas. Estos autores estudiaron productos lácteos ácidos, tales como el suero de mantequilla, la crema ácida y el yogur y manifestaron haber observado la inactivación de *S. aureus* (10^8 /ml) en un medio artificial con ácido láctico así como una disminución de 4 ciclos logarítmicos, tras 24 h de incubación a pH 4.3 (MINOR y MARTH, 1972b). La inactivación inicial de *S. aureus* en los productos lácteos fue, por lo tanto, no tan alta como la detectada en los medios artificiales. La supervivencia de los estafilococos en los medios artificiales pareció estar en función principalmente de la concentración de hidrogeniones, mientras que el comportamiento de *S. aureus* en los derivados lácteos se relacionaría con otros factores además del pH.

Aunque el pH óptimo para el crecimiento de las cepas enterotoxigénicas de *S. aureus* esté cercano a 7, éste tiene lugar en los valores extremos de pH dependiendo de otros factores tales como el producto alimenticio, el tipo de ácido, la concentración de ciertos ingredientes como la sal, el azúcar y las especias y la capacidad tamponizante de otros como, por ejemplo, el huevo. Las ensaladas suelen estar

generalmente refrigeradas, de forma que se evita la proliferación de los microorganismos. A temperaturas más elevadas, la acidez puede ser insuficiente para impedir el crecimiento y la síntesis de enterotoxinas. LONGREE et al. (1959) informaron que tanto la ensalada de pavo como la de patata con huevo añadido eran capaces de permitir el crecimiento de los estafilococos. Los valores de recuento tras 20 horas de incubación a 30°C incrementó hasta 10^8 , partiendo de un inóculo de 10^3 .

El efecto de los ácidos sobre los microorganismos puede ser debido a la concentración de hidrogeniones, aunque la respuesta de los microorganismos patógenos a la acidez varía con la cepa, tamaño del inóculo y producto alimenticio, así como con el tipo de ácido utilizado para ajustar el pH. CATHCART et al. (1947) hallaron que este último parámetro es tan importante como el propio pH que inhibe el crecimiento estafilocócico. El ácido acético es más inhibitorio para *Staphylococcus aureus* que lo es el ácido láctico, que a su vez lo es más que el clorhídrico (GENIGEORGIS, 1981). En los rellenos de queso, el ácido láctico resultó en una inhibición completa en valores de pH inferiores a 4.57, mientras que por debajo de 5.12 resultaban en una inhibición gradual. Se conoce que la anaerobiosis afecta el pH mínimo para el inicio del crecimiento de *S. aureus* (FOX y HOLTMAN, 1966).

Diversos autores han mencionado las relaciones entre la temperatura, la actividad de agua (a_w) y el potencial de

oxidación-reducción (Eh) (GENIGEORGIS, 1981). En general, cuanto mayor es el índice inicial y más óptimas las otras condiciones, el rango de pH en el que se pueden desarrollar los estafilococos es más amplio.

Los experimentos realizados sobre la influencia del valor de pH sobre el crecimiento se han restringido principalmente al pH inicial. Las experiencias llevadas a cabo por GENIGEORGIS et al. (1971) mostraron que el pH inicial variaba considerablemente debido al crecimiento de *S. aureus*. Por ejemplo, un pH inicial de 4.2 incrementó a 8.5 tras 6 días de incubación a 37°C en un medio líquido conteniendo hidrolizado de proteína. De no hallarse presentes azúcares fermentables en el medio de crecimiento, el pH incrementará con la multiplicación de *S. aureus*. Por el contrario, en presencia de azúcares fermentables, como la sacarosa, el pH disminuirá. Por lo tanto, el efecto del pH inicial sobre la producción de enterotoxinas sólo puede ser estudiado en condiciones controladas de pH.

El pH mínimo que permite el crecimiento y la síntesis de enterotoxinas ha sido estudiado por múltiples autores, hallándose en la bibliografía datos discrepantes sobre este particular. Las cifras citadas son muy diversas, pero oscilan entre los valores de 4.0 y 5.5. Según GENIGEORGIS y SADLER (1966) en BHI en presencia de oxígeno, el pH ha de ser superior a 5.05 para que se sintetice EEE. SCHEUSNER et al. (1973) manifestaron que si bien el crecimiento de la cepa 243

(productora de EEB) tenía lugar a pH entre 4.76 y 9.40, la síntesis de EEB sólo era detectable a valores de pH entre 5.15 y 9.02. En el primer valor de pH se detectó la citada enterotoxina tras 154 h de incubación en un medio de laboratorio a 37 °C, pero cuando el pH fue de 5.0 no se pudo constatar su presencia.

KATO et al. (1966) determinaron por gel difusión que la producción máxima de EEA tenía lugar a pH 6.0-6.5 (4.2 µg/ml), aunque a pH 5.0 sólo había disminuido en aproximadamente 0.5 µg/ml. Por otra parte, REISER y WEISS (1969) estudiaron cómo afectaba el pH en la síntesis de varias enterotoxinas en cuatro medios distintos. Sus resultados indican que el pH mínimo para la producción de la EEA es de 5.3, para la EEB, de 6.0, y para la EEC de 6.8. Así mismo, observaron que a pH inicial de 6.8, es superior el rendimiento de la EEB y de la EEC que a 6.0 ó 5.3, pero con la EEA no queda afectada la producción.

En 1973, METZGER et al. (1973) expresaron que para la síntesis de EEB el pH óptimo se establecía en 7.0. A pH 8.0 se detectaban cantidades mínimas de enterotoxina, mientras que a pH 6.0 se había producido una reducción del 50%. Anteriormente, GENIGEORGIS et al. (1971) informaron que para la síntesis de EEC, el pH óptimo era de 5.5 a 6.5, mientras que para el crecimiento de la cepa 137 que lo producía era entre 5 y 6.5.

Por otra parte, BARBER y DEIBEL (1972) manifestaron haber detectado EEA producida por la cepa 100 a pH 5.0 en condiciones de aerobiosis y a 5.5 en anaerobiosis. En esta experiencia, los valores de pH que permitieron el crecimiento de las células en aerobiosis y en anaerobiosis fueron 4.6 y 5.7, respectivamente. En experimentos de variables mixtas, TOMPKIN et al. (1973) informaron que la síntesis de EEA (igual cepa que en la experiencia anterior) se producía en un valor de pH superior a 5.58 cuando era incubada a 10°C en condiciones de anaerobiosis. Estos mismos autores estudiaron el efecto combinado del pH y de la concentración de ClNa y de nitritos sobre la producción de EEA en medio BHI. El pH absoluto mínimo en el que registraron síntesis fue de 4.9. A una concentración del 3% de sal, el pH correspondiente fue de 5.3, mientras que cuando además adicionaban 75 ó 300 µg/ml de NO_2Na , fue de 5.7. A pH 7.0, el máximo de ClNa fue de 9%, no afectándose la síntesis de EEA al añadir nitrito. A pH 4.5 y con 3% de sal se producía el crecimiento de *Staphylococcus*.

NOTERMANS y HEUVELMAN (1983) notificaron que el crecimiento de *Staphylococcus* tenía lugar a pH 4.6 pero no a pH 4.3. En el valor más bajo se observó una disminución del número de células activas supervivientes. GENIGEORGIS et al. (1971) anunciaron que el crecimiento a pH 4.0 era factible con un inóculo de 10^8 *Staphylococcus* /ml y a pH 4.3 con un inóculo de 10^6 células/ml (GENIGEORGIS, 1972) a 37°C. Sin embargo, cuando la concentración de ClNa se elevaba al 10%, el pH quedaba reducido entre los límites de 5.45 y 7.30.

CARPENTER y SILVERMAN (1976) y JARVIS et al. (1973) estudiaron la síntesis de enterotoxinas estafilocócicas en condiciones controladas de pH, concluyendo que tenía lugar en todas las condiciones de pH analizadas. Sin embargo, sólo se estudió el pH en el intervalo de 6.0 a 8.0.

La temperatura óptima para el crecimiento de *S. aureus* es de 37°C (LANDOLT et al., 1964). Esta temperatura es también óptima para la síntesis de enterotoxina (BAIRD-PARKER, 1971). Por lo tanto, la mayoría de las experiencias acerca del efecto de la actividad de agua y del pH sobre la producción de enterotoxinas se han realizado a 37°C a 30°C. MARLAND (1967) manifestó que la síntesis de EEB se producía en las temperaturas entre los límites de 15.2 a 43.2°C, pero que en los valores extremos de temperatura la cantidad de enterotoxina sintetizada era despreciable. GENIGEORGIS et al. (1969) indicaron la producción de EEB en carne curada mantenida en condiciones anaerobias durante dos meses a 10°C.

La producción de EEB en jamón salazonado ha sido estudiado por GENIGEORGIS et al. (1969). Al igual que en la experiencia de TOMPKIN et al. (1973) es función del pH y de las concentraciones de ClNa y de nitratos. En anaerobiosis, la producción de EEB tiene lugar sólo a pH superior a 5.3 y con la concentración de ClNa inferior a 9.2% y de ácido nitroso disociado inferior a 0.54 ppm. Posteriormente, GENIGEORGIS et al. (1971) estudiaron el efecto del cloruro sódico y del

pH sobre la producción de enterotoxina C, concluyendo que seguía el mismo modelo que la EEB: a medida que incrementaba la concentración de ClNa de 0 a 10%, la cantidad de enterotoxina disminuía a valores no detectables, a la vez que el rango de pH era más restringido. Así, la EEC era producida a pH entre 4 y 9.83 con el 0% de ClNa, entre 4.40 y 9.43 con el 4%; entre 4.50 y 8.55 con el 8%. Con el 12% no se pudo detectar EEC a ningún valor de pH.

La mayonesa y las salsas de mesa retrasan la putrefacción de los alimentos y el crecimiento de los microorganismos patógenos debido a la elevada concentración de ácido acético. Los datos recogidos por SMITTLE (1977) indican que las salsas comerciales con un pH de 4.1 ó menos son letales para los estafilococos. MORITA y WOODBURN (1983) señalaron que las salsas estudiadas por ellos, tanto comerciales como preparadas en el laboratorio, tienen un pH de 3.4, pero con la adición de los ingredientes de la ensalada incrementó el pH al menos a 4.0, resultando en incrementos de diez ó 100 veces tras 8 h de incubación a 37°C. Igualmente, indicaron que la adición de los huevos cocidos incrementaba el pH inicial, y en algunos casos también los niveles de enterotoxina.

Por otra parte, DYLE et al. (1982) analizaron la síntesis de enterotoxinas en ensaladas de carne preparadas con mayonesa. Concluyeron que se observaba una disminución notoria en los números inmediatamente tras su adición a ensaladas de pollo o

de jamón que contenían mayonesa. Cuando la mayonesa se halla presente en la ensalada de carne, en el choque inicial se inactiva una parte sustancial de la población de *S. aureus* (30-60%). La refrigeración de las ensaladas a 4°C se erigió como un medio efectivo de supresión del crecimiento en presencia o en ausencia de mayonesa. Sus datos sugieren que el crecimiento disminuía de acuerdo con el incremento de la cantidad de mayonesa añadida a la ensalada. El pH de los ingredientes de la ensalada de pollo de 6.4 descendió a 6.1 al añadir mayonesa en la cantidad recomendada por la receta.

El huevo en las ensaladillas juega un papel fundamental. LONGREE et al. (1959) hallaron pocas diferencias en los recuentos finales en comparación con los niveles altos y bajos de huevo añadido. Las ensaladas con huevo picado o con clara de huevo picada mostraron poca diferencia en el pH tras 24 h de incubación, pero los recuentos fueron aproximadamente 10 veces superiores en aquéllas que contenían clara de huevo, detectándose EEC2 sólo en estas últimas. HARBRECHT y BERGDOLL (1980) hallaron diferencias entre las cepas de *S. aureus* al contaminar huevos duros. Las EEA y EEC1 se produjeron en cantidades muy inferiores a la EEB.

NG y GARIBALDI (1975) analizaron la capacidad antimicrobiana que posee el huevo crudo, principalmente por los efectos inhibitorios que ejerce la lisozima sobre las bacterias gram positivas, y en concreto, sobre los estafilococos. Concluyeron que la acción de la lisozima no se debe atribuir

-297-

a sus propiedades líticas bacterianas, sino a la basicidad de la misma. Esta conclusión se apoya en que la lisozima muestra una actividad lítica óptima en valores de pH cercanos a la neutralidad y en que el sulfato de protamina, un polipéptido básico no enzimático, también produce la muerte de S.aureus a pH 8.0 pero no a 7.0.

B. RESULTADOS

- B.1. INFLUENCIA DEL pH DE LA MAYONESA
- B.2. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION
- B.3. INFLUENCIA DEL ACEITE UTILIZADO EN LA PREPARACION DE LAS MAYONESAS
- B.4. INFLUENCIA DEL INOCULO INICIAL
- B.5. EVOLUCION DEL DESARROLLO EN LAS DISTINTAS CEPAS.
- B.6. VARIACIONES DEL pH DE LAS MUESTRAS
- B.7. RELACION ENTRE EL CRECIMIENTO DE *St aureus* Y LA PRODUCCION DE DESXIRRIBONUCLEASA TERMOESTABLE

Los resultados obtenidos por la inoculación de mayonesas con las distintas cepas de *St aureus* se representan de forma gráfica en las 26 figuras que siguen (Figuras RL1 a 26).

En primer lugar, se debe hacer constar que las características organolépticas de las mayonesas no sufrieron alteración alguna, en cuanto a aspecto, consistencia, color y olor tras catorce días de incubación, incluso cuando los valores de recuento registrados superaron 10^8 UFC/g.

Así mismo, es importante resaltar que no existieron diferencias significativas entre las cifras de recuento registradas en los dos medios de cultivo empleados (agar de

Figura RM 1: Representación gráfica del desarrollo de *S. aureus* cepa S6 en mayonesas en un periodo de 14 días de incubación.

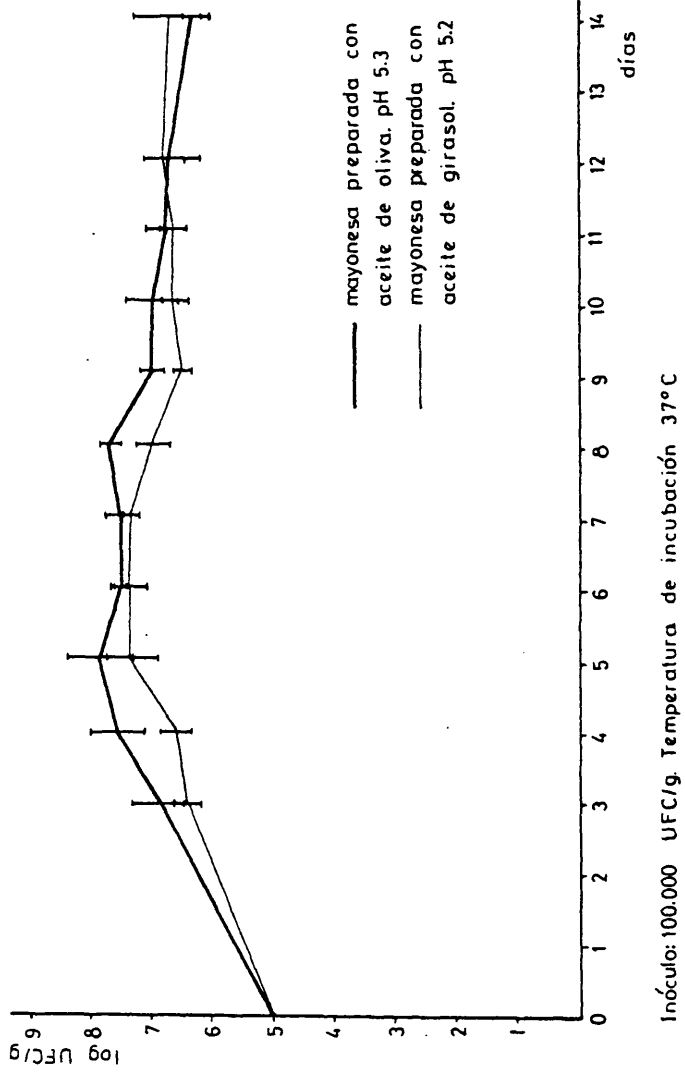


Figura RM 2: Representación gráfica del desarrollo de S. aureus cepa 100 en mayonesas en un periodo de 14 días de incubación.

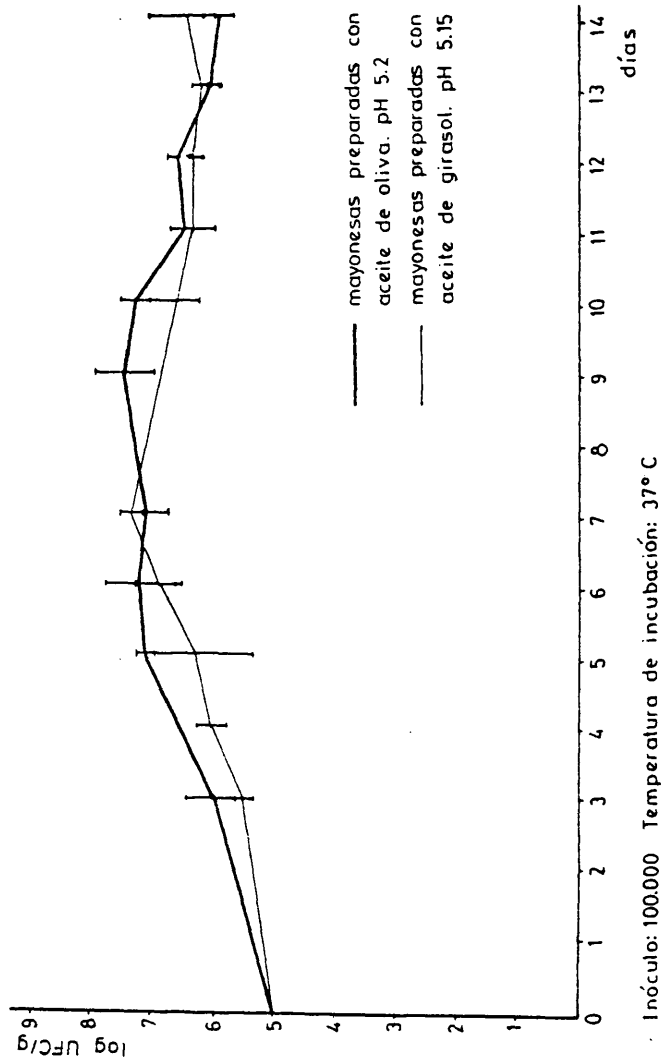


Figura RM3: Representación gráfica del desarrollo de *S.aureus* cepa 137 en mayonesas en un periodo de 14 días de incubación.

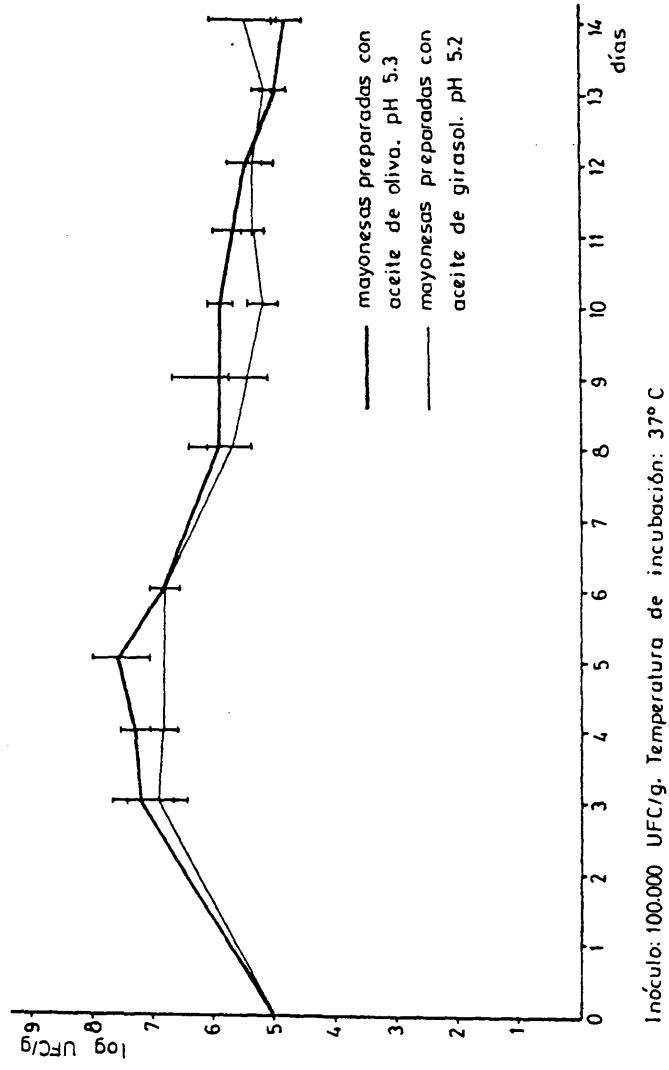


Figura RM 4: Representación gráfica del desarrollo de S.aureus cepa 350 en mayonesas en un periodo de 14 días de incubación.

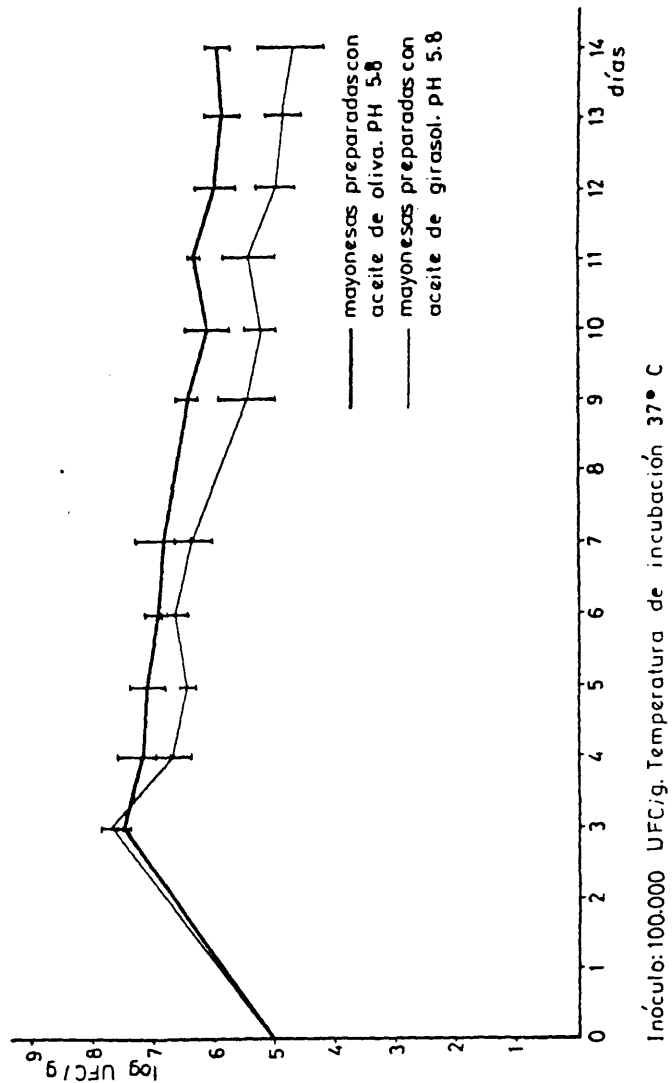


Figura RM 5: Representación gráfica del desarrollo de S.aureus cepa 379 en mayonesas en un periodo de 14 días de incubación.

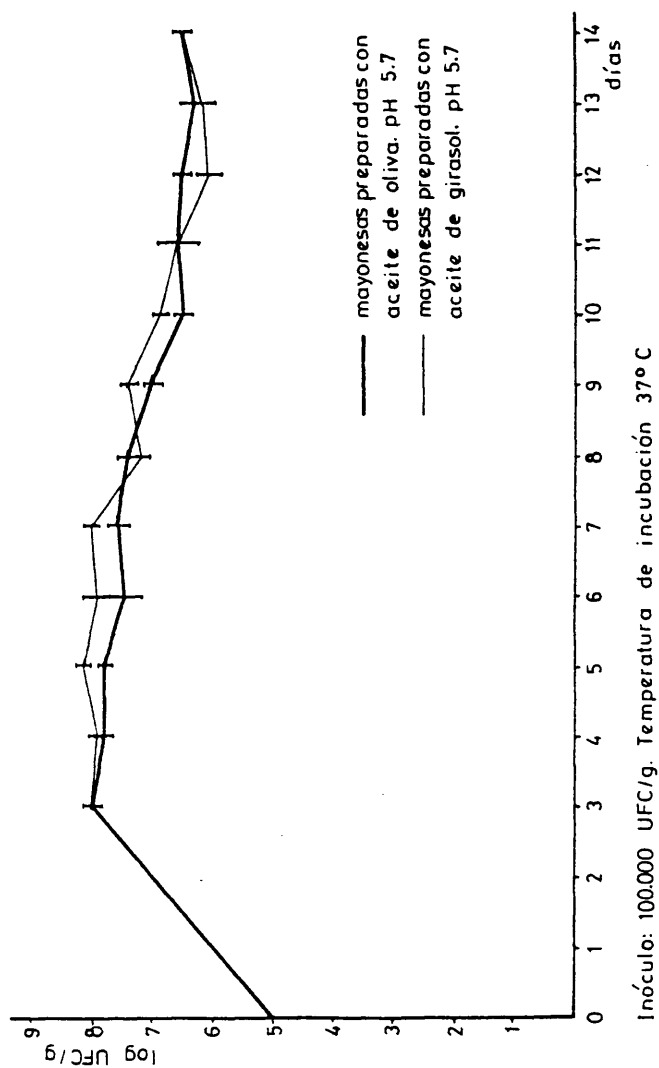


Figura RM 6: Representación gráfica del desarrollo de S.aureus cepa 472 en mayonesas en un periodo de 14 días de incubación.

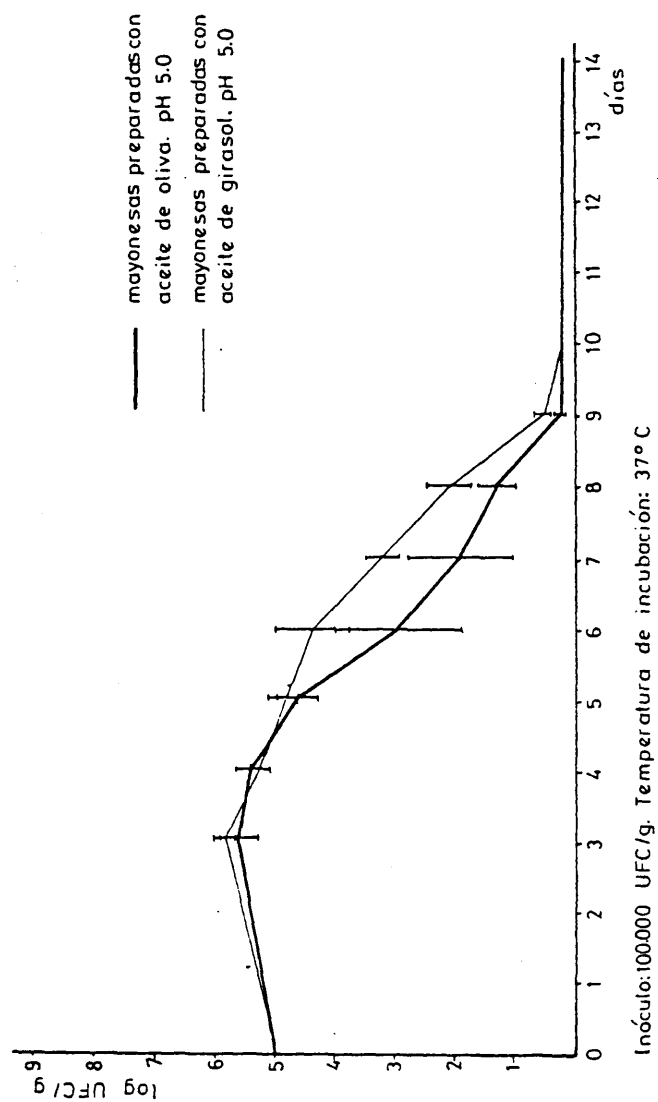


Figura RM 7: Representación gráfica del desarrollo de S.aureus cepa 472 en mayonesas en un periodo de 14 días de incubación.

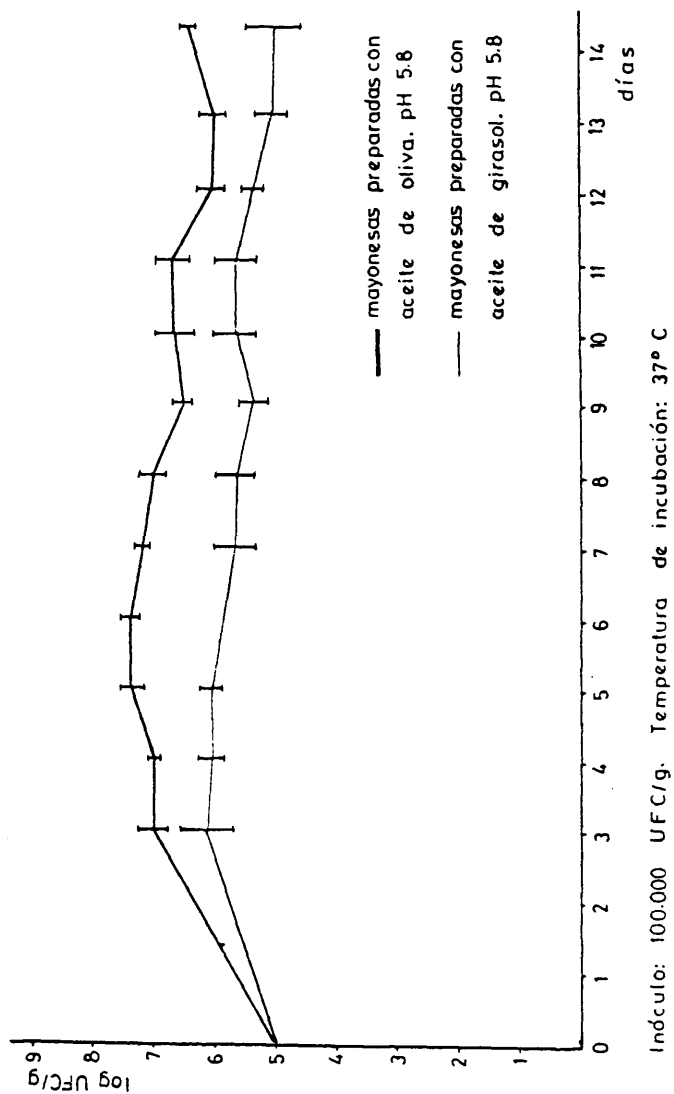


Figura RM 8: Representación gráfica del desarrollo de S.aureus cepa 913 en mayonesas en un período de 14 días de incubación,

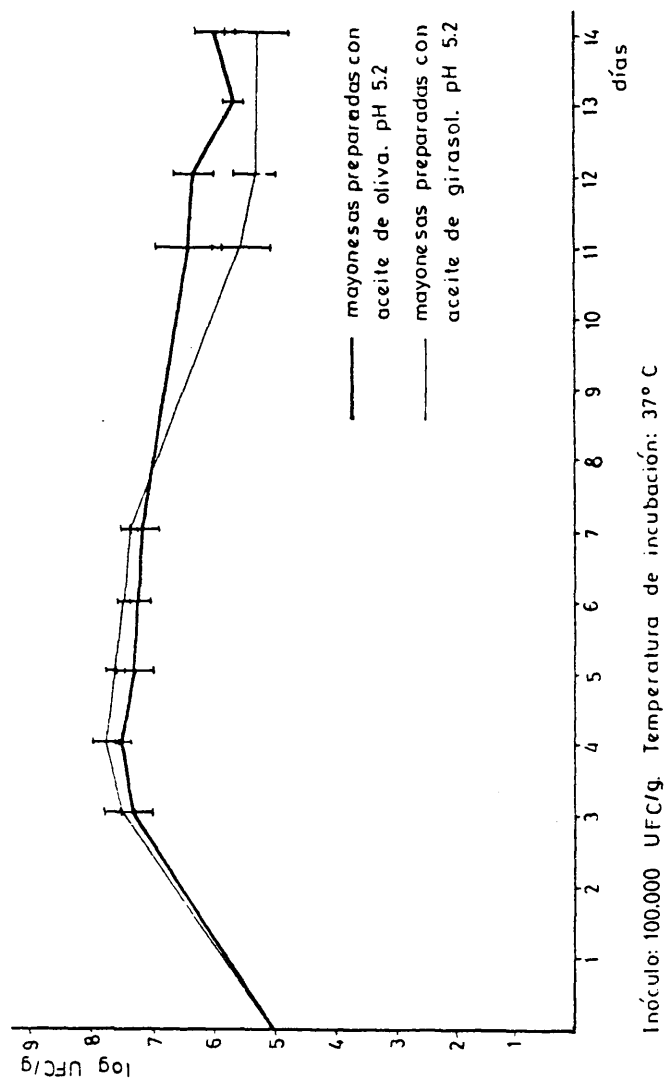
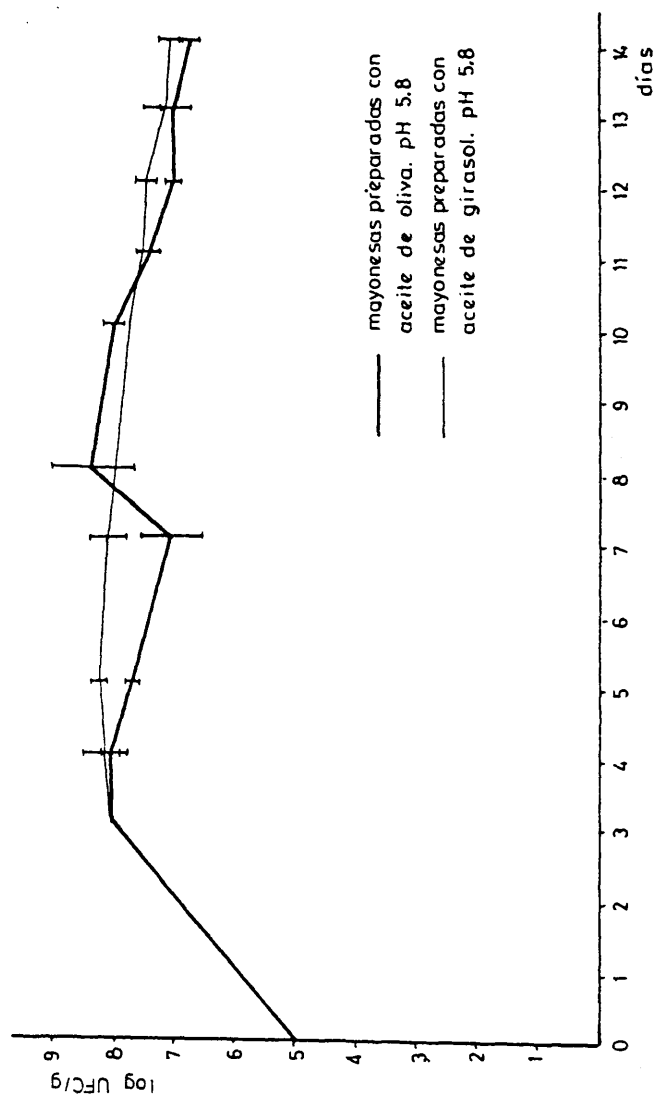


Figura RM 9: Representación gráfica del desarrollo de *S. aureus* cepa 1143 en mayonesas en un periodo de 14 días de incubación.



Inóculo: 100.000 UFC/g. Temperatura de incubación: 37°C

Figura RM 10: Representación gráfica del desarrollo de *S. aureus* cepa 1173 en mayonesas en un periodo de 14 días de incubación.

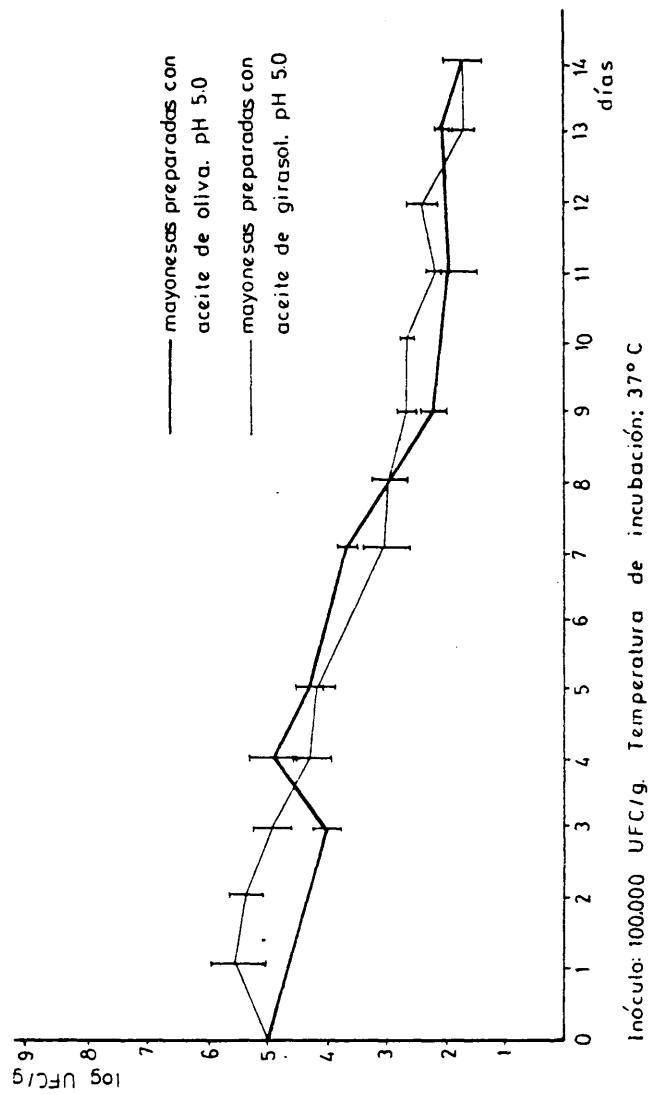


Figura RM 11: Representación gráfica del desarrollo de *S. aureus* cepa 1183 en mayonesas en un periodo de 14 días de incubación.

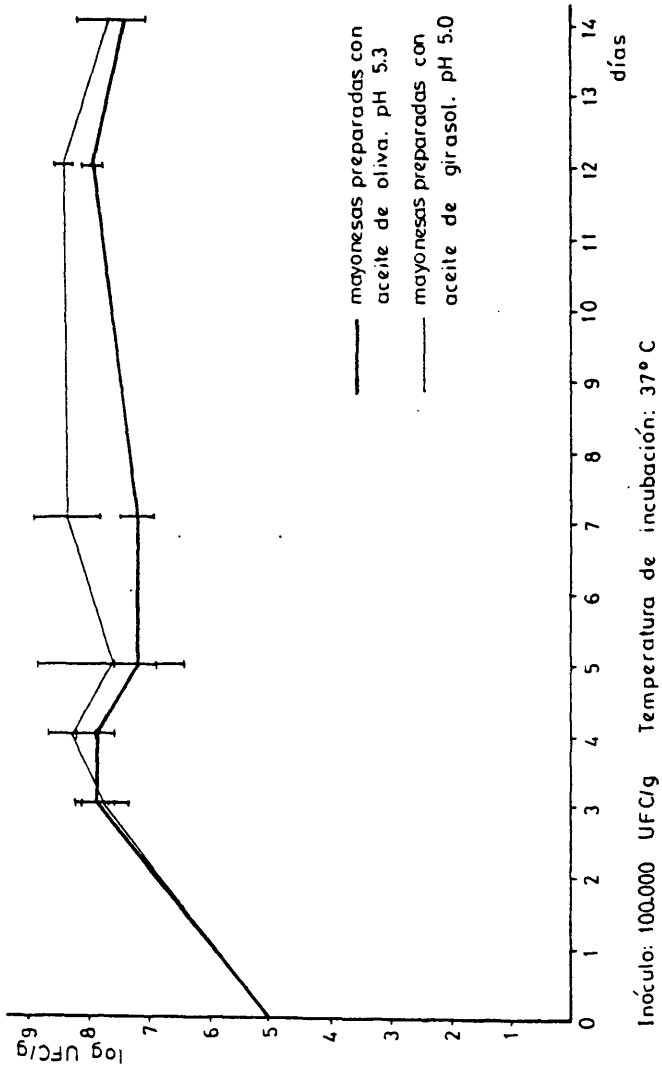
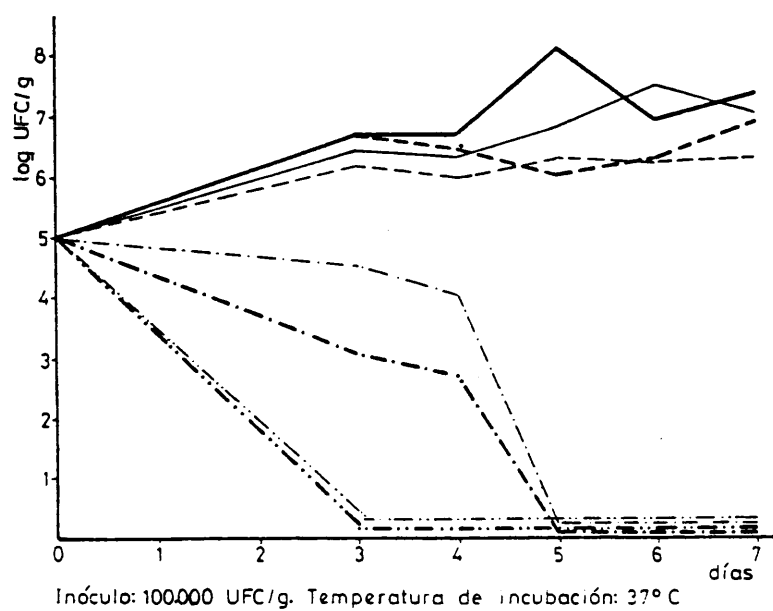


Figura RM 12: Representación gráfica de la influencia del pH de mayonesas sobre el desarrollo de S.aureus cepa S6.



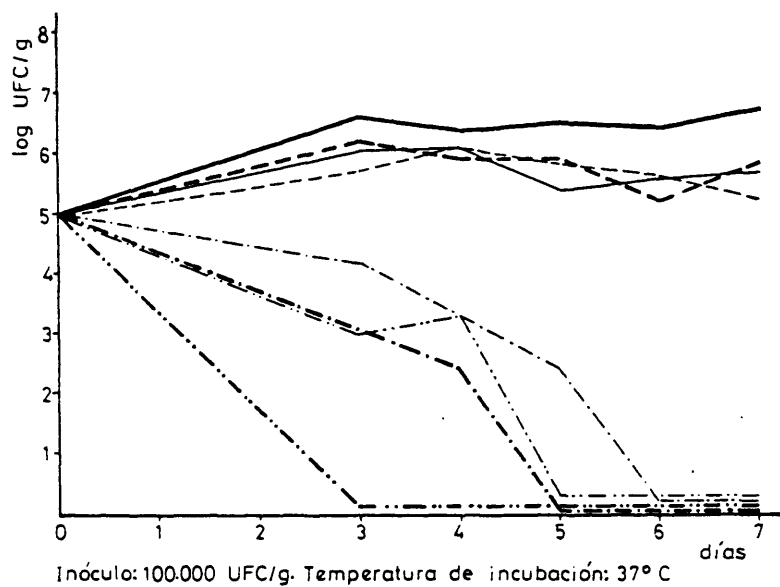
pH 5.6 mayonesas preparadas con: aceite de oliva. —
 aceite de girasol. —

pH 5.2 mayonesas preparadas con: aceite de oliva. ---
 aceite de girasol. ---

pH 4.8 mayonesas preparadas con: aceite de oliva. -.-.-
 aceite de girasol. -.-.-

pH 4.5 mayonesas preparadas con: aceite de oliva.
 aceite de girasol.

Figura RM 13: Representación gráfica de la influencia del pH de mayonesas sobre el desarrollo de S.aureus cepa 137.



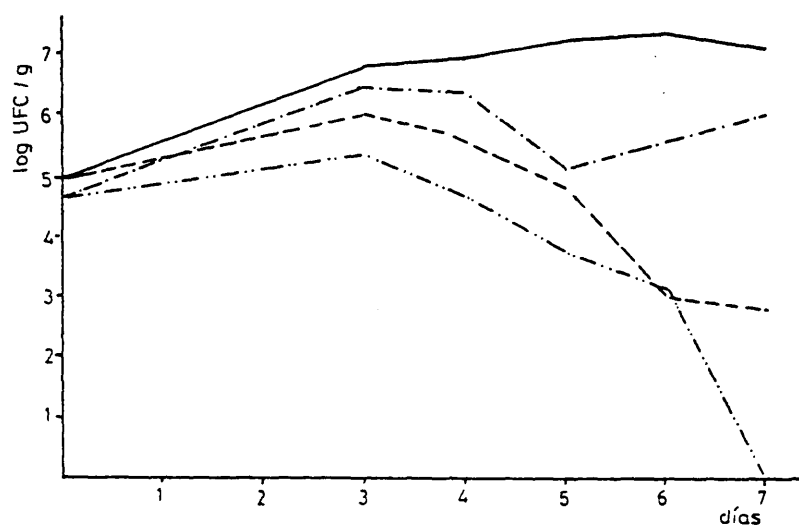
pH 5.5 mayonesas preparadas con: aceite de oliva. —
 aceite de girasol. — — — — —

pH 5.2 mayonesas preparadas con: aceite de oliva. - - - - -
 aceite de girasol. - - - - -

pH 4.8 mayonesas preparadas con: aceite de oliva. - . - . -
 aceite de girasol. - . - . -

pH 4.5 mayonesas preparadas con: aceite de oliva.
 aceite de girasol.

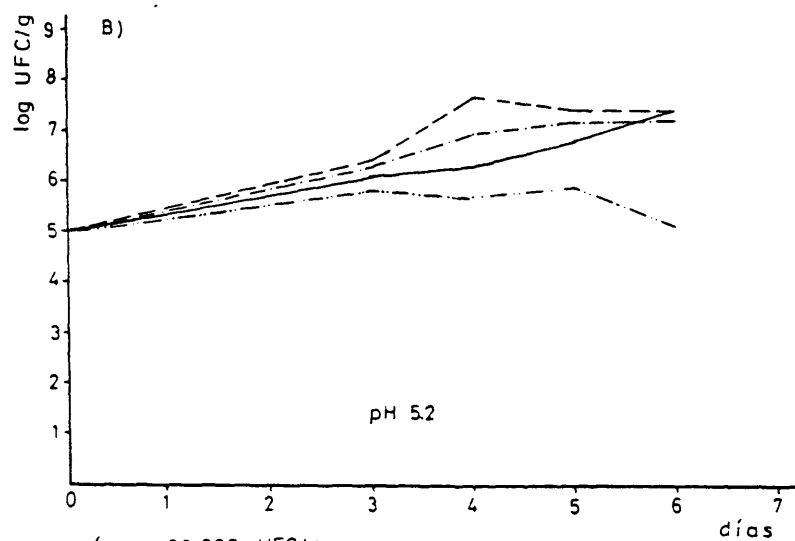
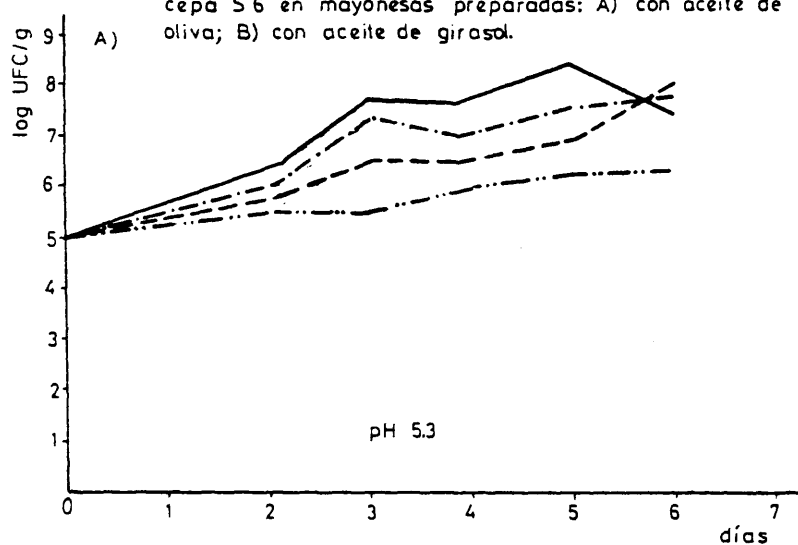
Figura RM 14: Representación gráfica de la influencia del pH de mayonesas preparadas con aceite de oliva sobre el desarrollo de S. aureus cepa 472.



Temperatura de incubación: 37°C

- inóculo 100.000 UFC/g, pH 5.8
- inóculo 100.000 UFC/g, pH 5.0
- .-.-.- inóculo 50.000 UFC/g, pH 5.8
- inóculo 50.000 UFC/g, pH 5.0

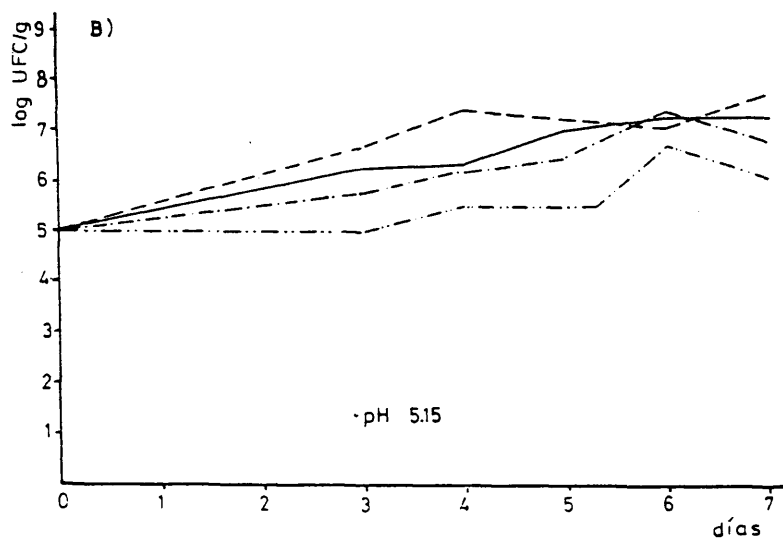
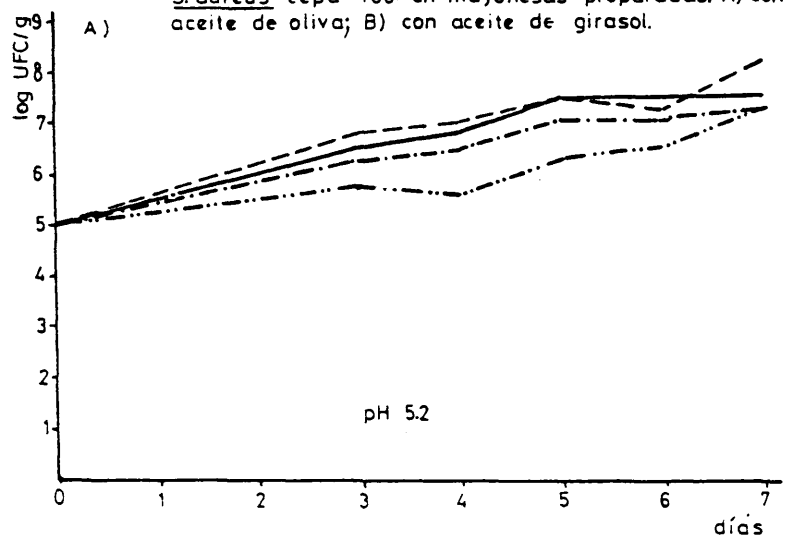
Figura RM 15: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de *S. aureus* cepa S 6 en mayonesas preparadas: A) con aceite de oliva; B) con aceite de girasol.



Inóculo: 100.000 UFC/g

- - - - - 22° C
 - . - . - 28° C
 - - - - - 37° C
 - - - - - 44° C

Figura RM 16: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de *S. aureus* cepa 100 en mayonesas preparadas: A) con aceite de oliva; B) con aceite de girasol.



Inóculo: 100.000 UFC/g

--- 22° C
 -.- 28° C
 — 37° C
 ... 44° C

Figura RM 17: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de *S. aureus* cepa 137 en mayonesas: A) preparadas con aceite de oliva; B) preparadas con aceite de girasol.

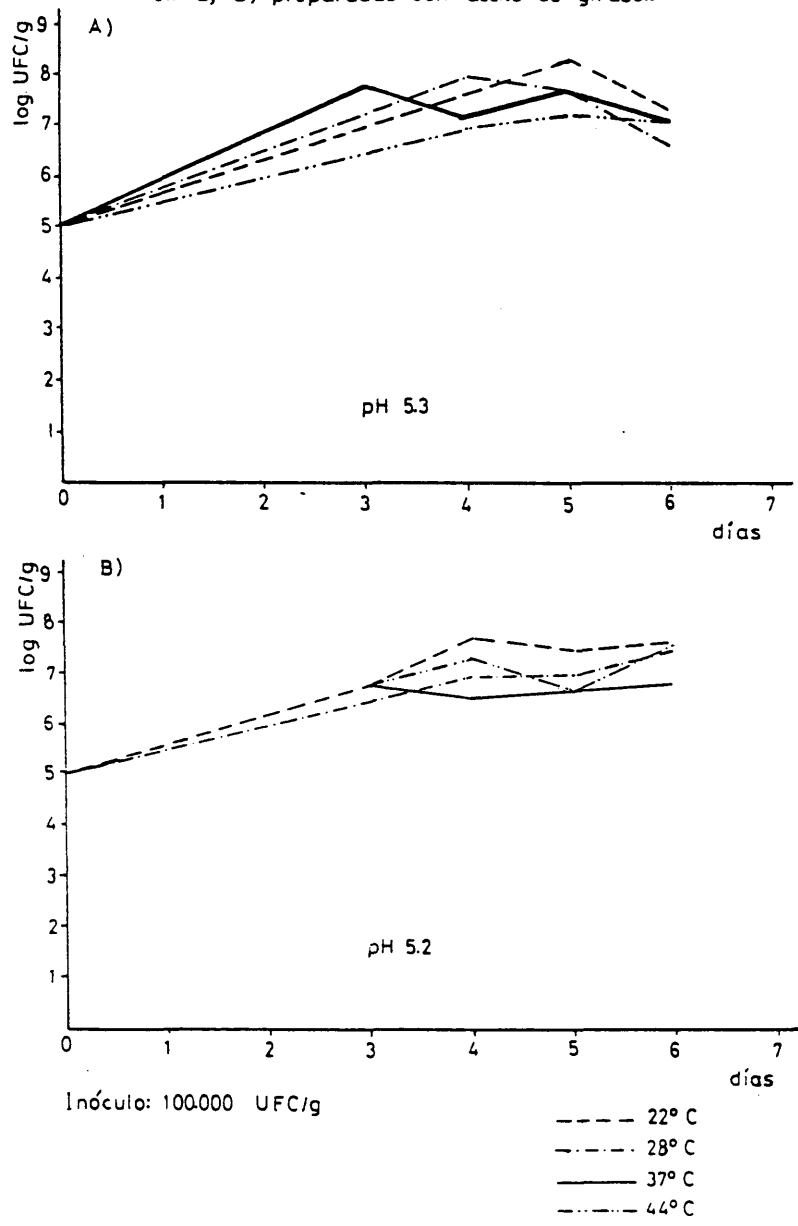
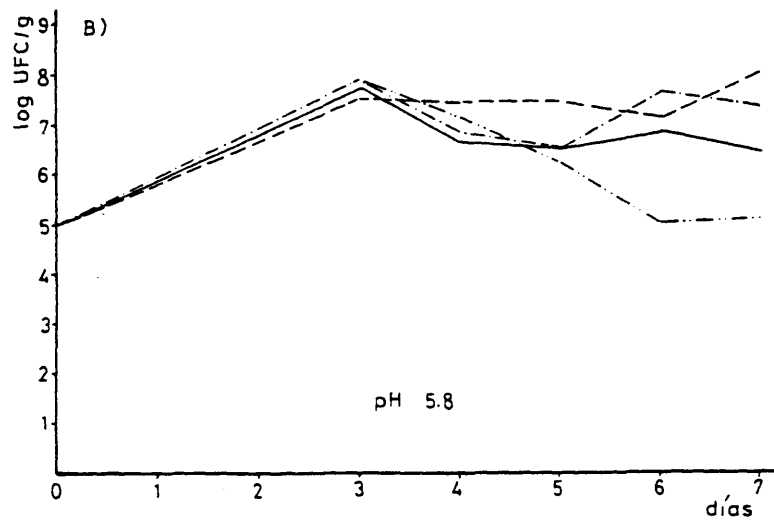
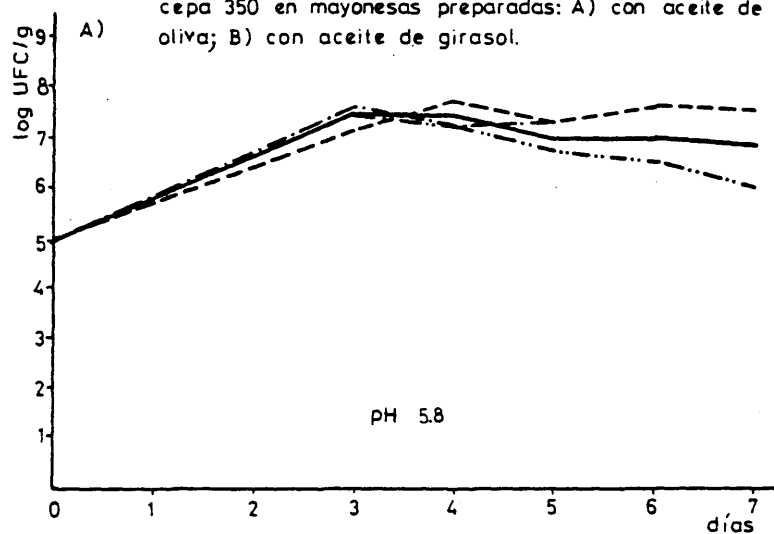


Figura RM 18: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de *S.aureus* cepa 350 en mayonesas preparadas: A) con aceite de oliva; B) con aceite de girasol.



Inócula: 100 000 UFC/g

- - - - - 22° C
 - - - - - 28° C
 - - - - - 37° C
 - - - - - 44° C

Figura RM 19: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de S. aureus cepa 379 en mayonesas preparadas con aceite de girasol.

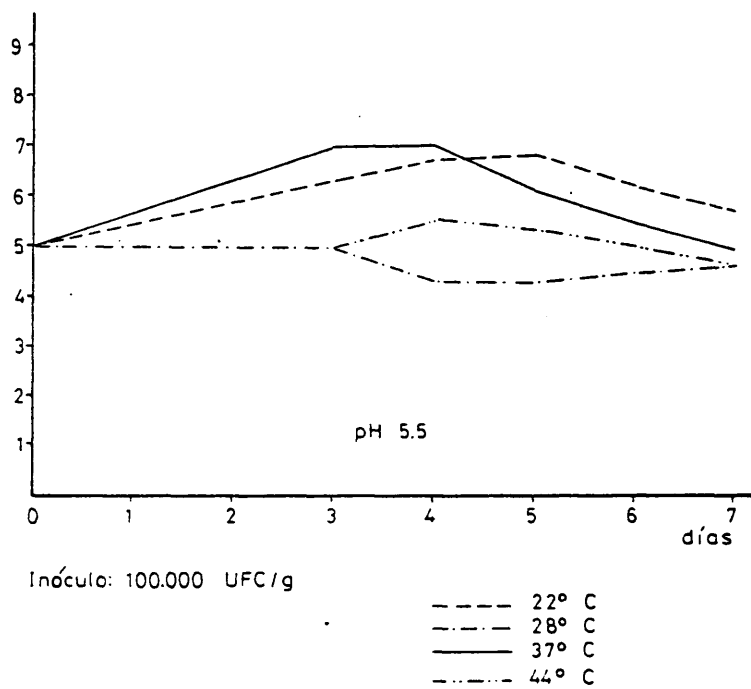
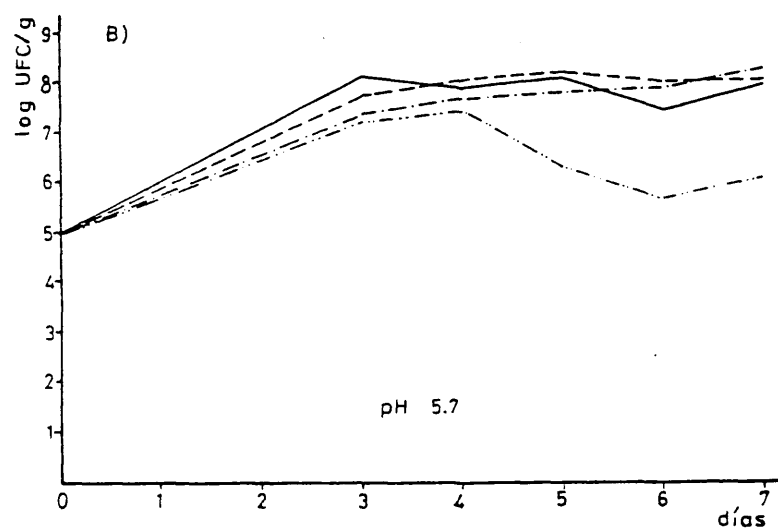
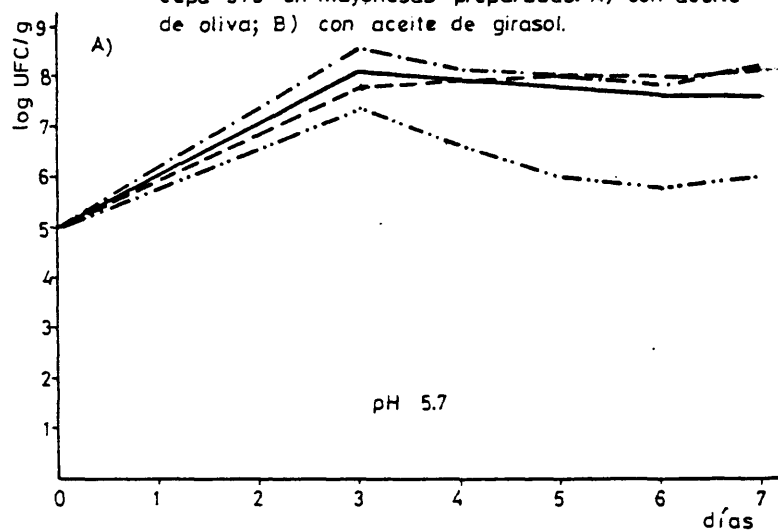


Figura RM 20: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de *S.aureus* cepa 379 en mayonesas preparadas: A) con aceite de oliva; B) con aceite de girasol.



Inóculo: 100.000 UFC/g

--- 22° C
 - - - 28° C
 ——— 37° C
 - · - 44° C

Figura RM 21: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de *S. aureus* cepa 472 en mayonesas: A) preparadas con aceite de oliva; B) preparadas con aceite de girasol.

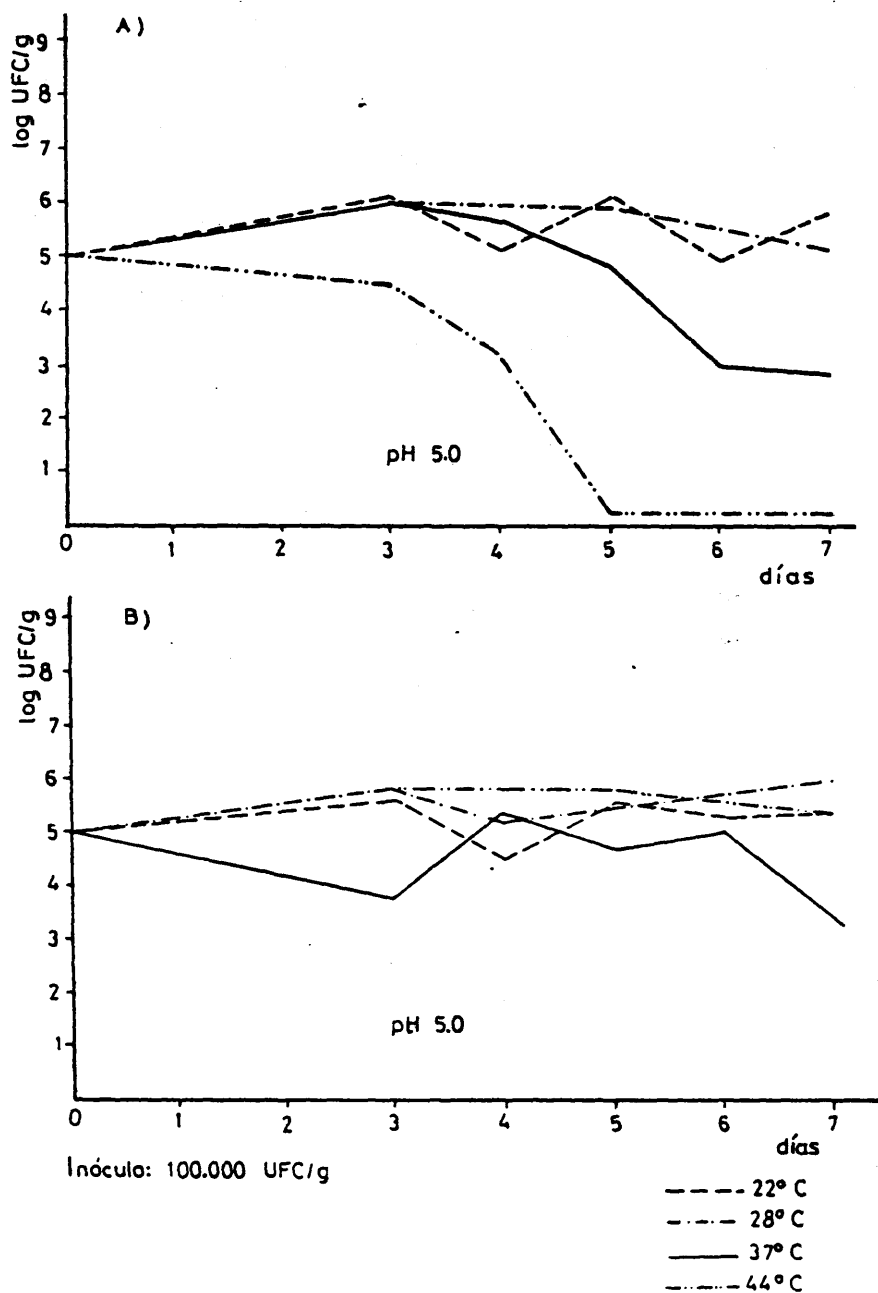
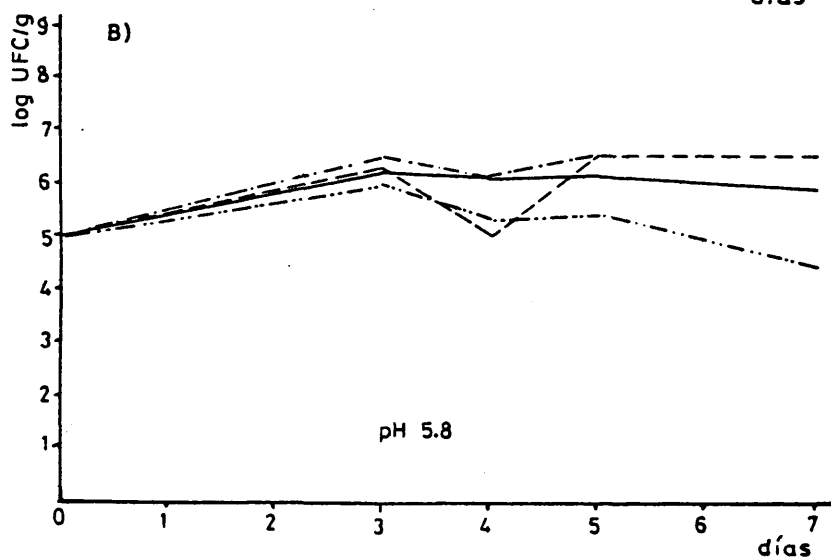
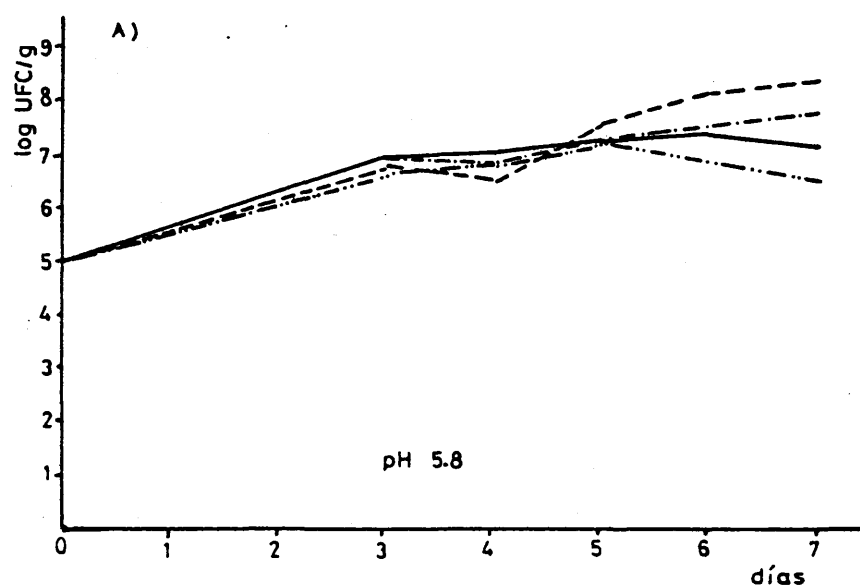


Figura RM 22: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de S.aureus cepa 472 en mayonesas: A) preparadas con aceite de oliva; B) preparadas con aceite de girasol.



Inóculo: 100.000 UFC/g

----- 22°C
 -.-.-.- 28°C
 _____ 37°C
 44°C

Figura RM 23: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de S.aureus cepa 913 en mayonesas preparadas: A) con aceite de oliva; B) con aceite de girasol.

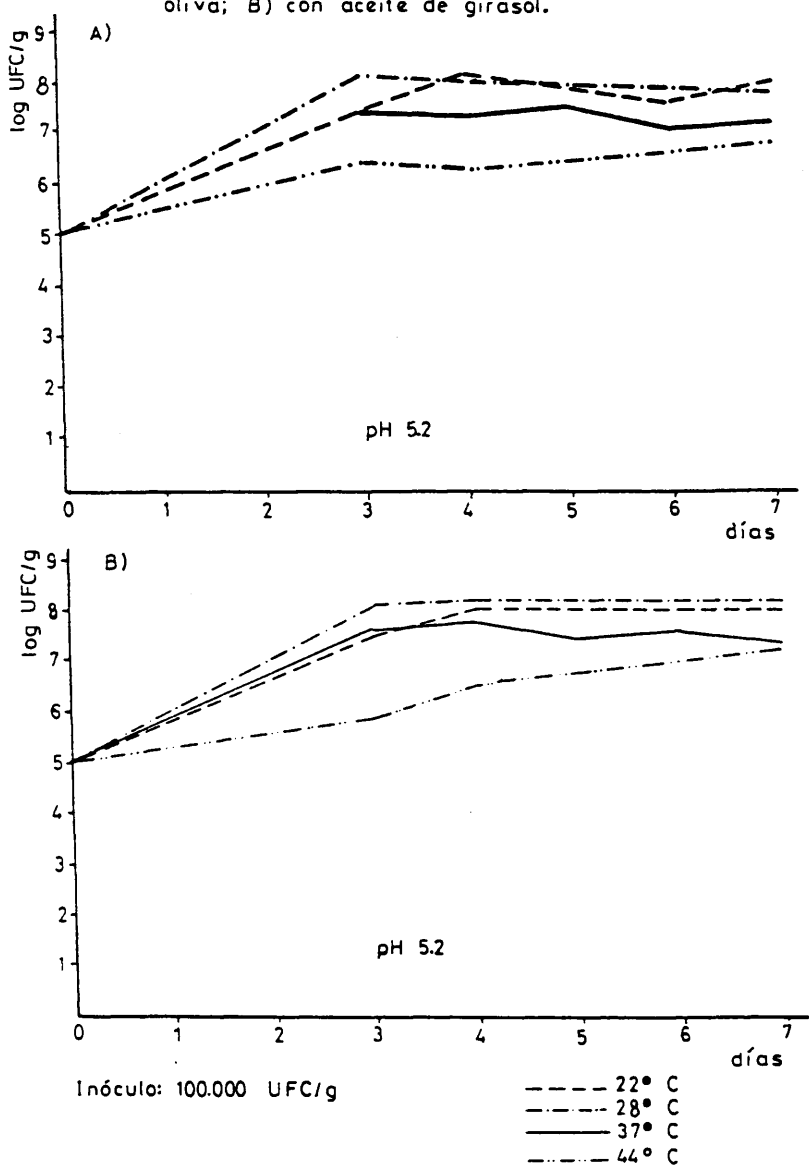
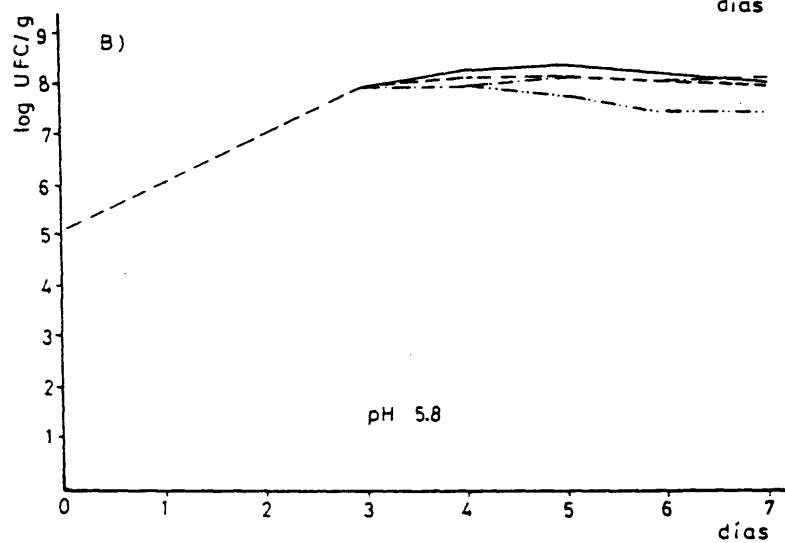
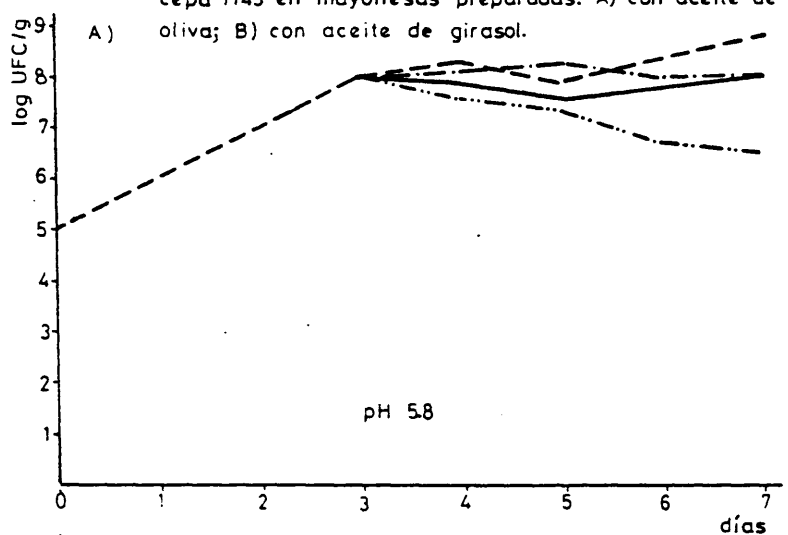


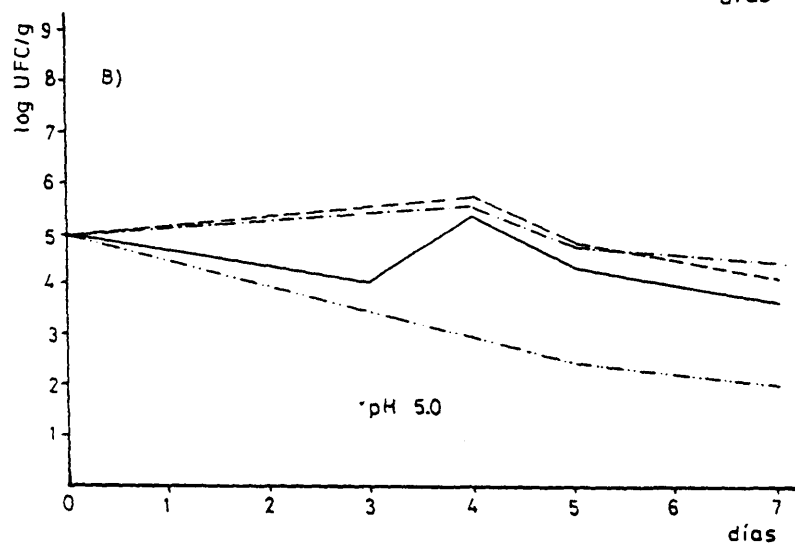
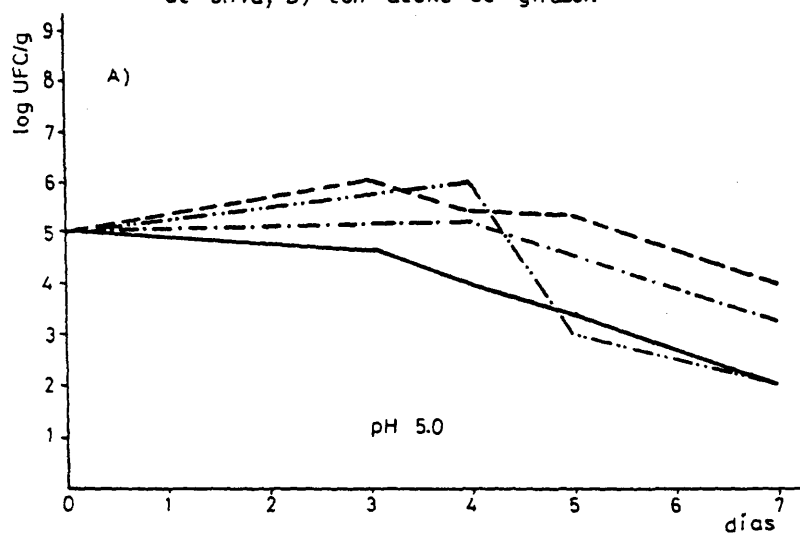
Figura RM 24: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de S. aureus cepa 1143 en mayonesas preparadas: A) con aceite de oliva; B) con aceite de girasol.



Inóculo: 100.000 UFC/g

- - - - - 22° C
 - . - . - 28° C
 ——— 37° C
 44° C

Figura RM 25: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de *S. aureus* cepa 1173 en mayonesas preparadas: A) con aceite de oliva; B) con aceite de girasol.



Inóculo: 100.000 UFC/g

--- 22° C
 -.- 28° C
 — 37° C
 ... 44° C

Figura RM 26: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de *S. aureus* cepa 1183 en mayonesas: A) preparadas con aceite de oliva; B) preparadas con aceite de girasol.

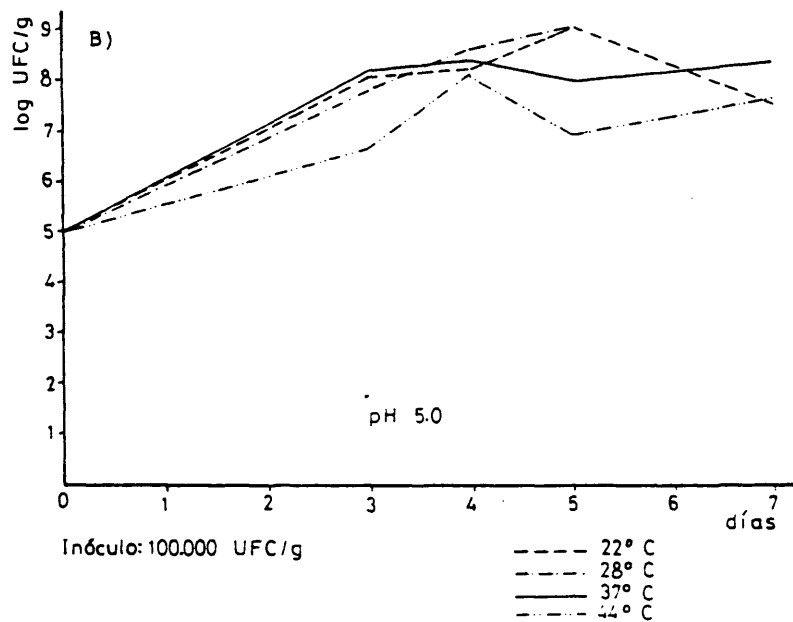
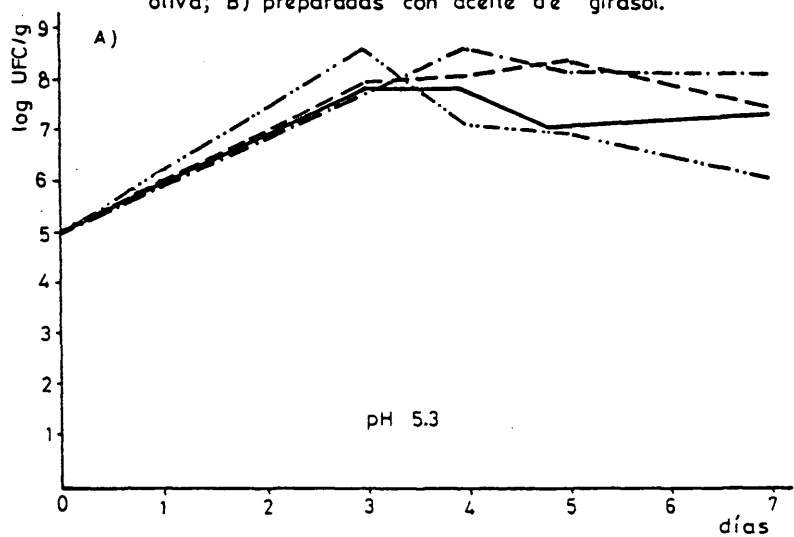


Figura RM 27: Valor medio del log de UFC / g, independientemente de la cepa, inoculada en mayonesas preparadas con ambos tipos de aceite, habidos en cada temperatura

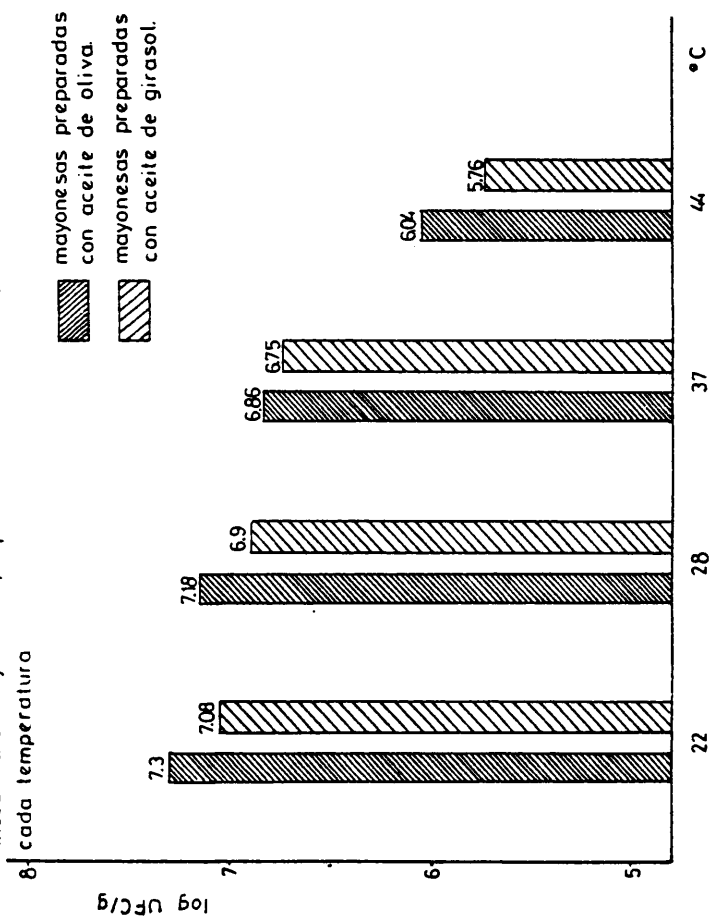


Figura RM 28: Variaciones en el crecimiento de S. aureus inoculado en mayonesas segun el pH inicial

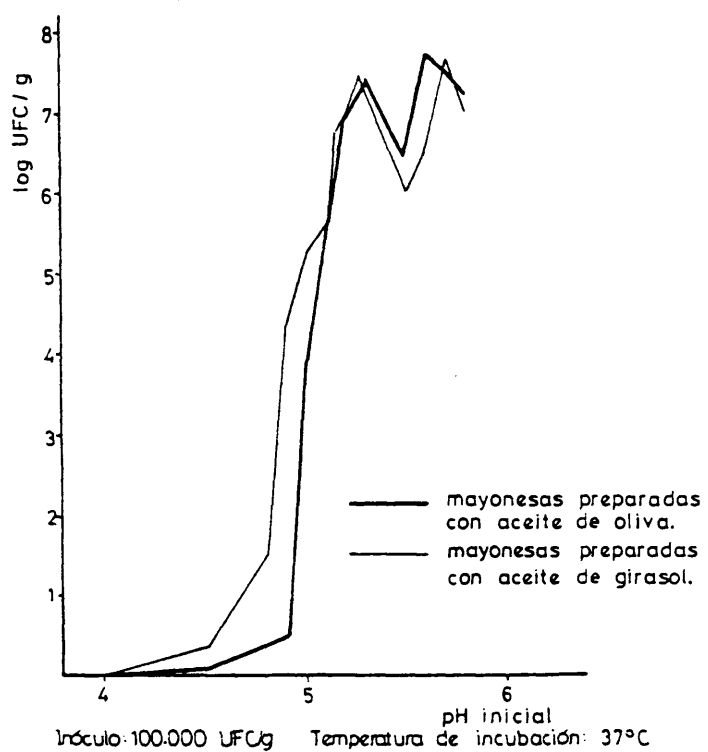


Tabla RM 1: Comparación del valor medio del logaritmo de las UFC/g computadas en un periodo de 7 días en mayonesas incubadas a diferentes temperaturas.

CEPA	MAYONESA (a) pH		Temperatura de incubación			
			22°C	28°C	37°C	44°C
S6	O	5.3	7.7	7.7	7.9	6.5
	G	5.2	7.2	7.1	7.2	6.3
100	O	5.2	7.7	7.1	7.2	6.6
	G	5.15	7.3	6.9	7.2	6.1
137	O	5.3	7.85	7.5	7.4	7.0
	G	5.2	7.5	7.2	6.5	7.15
472	O	5.0	5.6	5.7	4.3	1.5
	G	5.0	5.24	5.7	4.7	5.6
472	O	5.8	7.4	7.2	7.1	6.8
	G	5.8	6.4	6.4	6.1	5.4
913	O	5.2	7.8	7.95	7.3	6.4
	G	5.2	7.9	8.1	7.6	6.6
1143	O	5.8	8.1	8.1	7.55	7.3
	G	5.8	8.05	8.1	8.1	7.8
1173	O	5.0	5.2	4.35	3.2	3.0
	G	5.0	4.9	4.9	4.3	0
1183	O	5.3	7.9	8.1	7.4	7.3
	G	5.0	8.3	8.5	8.25	7.15
350	O	5.8	7.4	7.4	7.1	6.8
	G	5.8	7.4	7.2	6.8	6.2
379	O	5.7	7.9	8.2	7.8	6.4
	G	5.7	7.9	7.8	7.9	6.6
379	G	5.5	6.5	4.4	5.9	5.3

(a) O: mayonesa preparada con aceite de oliva; G: mayonesa preparada con aceite de girasol.

Tabla RM 2: Valor medio del logaritmo del número de UFC/g contabilizados en cada temperatura a los diferentes valores de pH, con referencia al aceite empleado en la preparación de las mayonesas.

pH	Temperatura de incubación							
	22°C		28°C		37°C		44°C	
	G	O	G	O	G	O	G	O
4.0					0			
4.5	0	0	0	0	0.3	0.3	0	0
4.8					1.6			
4.9				0	4.4	0.8		0
5.0	6.1	5.4	6.3	5.0	5.2	3.8	4.2	1.7
5.1					5.7			
5.15	7.3		6.9		6.9	7.0	6.1	
5.2	7.5	7.7	7.3	7.5	6.9	7.0	6.7	6.5
5.25					7.5			
5.3		7.8		7.7		7.4		6.9
5.5	6.5		4.4		6.6	6.5	5.3	
5.6					6.6	7.8		
5.7	7.9	7.9	7.8	8.2	7.9	7.8	6.6	6.4
5.8	7.3	7.6	7.2	7.5	7.2	7.2	6.4	7.0
media	7.0	7.3	6.8	7.2	6.4	6.8	5.8	5.9

G: mayonesas preparadas con aceite de girasol; O: mayonesas preparadas con aceite de oliva.

Tabla RM 3: Valores de pH finales registrados en las diferentes cepas durante cuatro periodos de incubación y cuatro temperaturas distintas.

CEPA	A	pH ₀	Días de incubación				Temperatura (°C)			
			4	7	11	14	22	28	37	44
S6	O	5.3	4.3	4.5	4.5	4.0	4.7	4.6	4.5	4.3
	G	5.2	4.3	4.7	4.1	4.6	4.8	4.7	4.7	4.5
100	O	5.2	5.1	5.0	4.9	4.8	5.2	4.9	5.0	4.9
	G	5.15	5.2	5.1	4.7	4.8	5.1	5.0	5.1	5.0
137	O	5.3	4.9	5.0	4.3	4.1	4.9	4.9	5.0	4.8
	G	5.2	4.9	5.0	4.1	4.9	4.9	4.9	5.0	4.8
350	O	5.8	4.9	NE		4.5	4.7	4.7		4.5
	G	5.8	5.1	5.0		4.9	5.0	5.0		4.7
379	O	5.7	4.6	4.3	4.5	4.6	4.3	4.5	4.3	4.6
	G	5.7	4.7	4.3	4.5	4.7	4.6	4.5	4.3	4.6
472	O	5.0	4.7	4.5	4.2	4.0	4.1	4.5	4.5	4.6
	G	5.0	4.5	4.5	4.0	3.9	4.2	4.2	4.5	4.5
472	O	5.8	5.1	4.8	4.6	5.8	4.1	4.7	4.8	4.7
	G	5.8		4.8			4.6	5.0	4.8	5.0
913	O	5.2		4.5	4.0	4.4	4.3	4.1	4.5	4.2
	G	5.2	4.1	4.3	4.0	4.1	4.2	4.0	4.3	4.5
1143	O	5.8	4.9	4.9		4.1	4.9	5.0	4.9	4.8
	G	5.8	5.0	5.0		4.0	5.1	5.2	5.0	4.9
1173	O	5.0		3.8			4.3	4.1	3.8	4.0
	G	5.0	4.0	4.2			4.1	4.0	4.2	4.0
1183	O	5.3	4.6	4.6	4.5	4.6	4.5	4.6	4.6	4.3
	G	5.0	4.9	4.6	4.5	4.8	5.5		4.6	4.5

A: Aceite empleado en la preparación de las mayonesas; O:oliva; G: girasol.

pH₀: pH inicial.

Inóculo 100.000 UFC/g.

Tabla RM4: Valor medio del logaritmo del número de UFClg registradas de forma diaria a lo largo de 14 días incubación.

			Días de incubación											
Cepa	A	pH	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
S6	O	5.3	6.8	7.6	7.9	7.5	7.5	7.7	7.0	6.9	6.8	6.7		6.4
	G	5.2	6.4	6.5	7.3	7.4	7.3	6.9	6.5	6.7	6.7	6.8		6.8
100	O	5.2	6.0		7.1	7.2	7.1			7.3	6.7	6.8	6.3	6.6
	G	5.15	5.7	6.1	6.4	6.8	7.3			6.7	6.5		6.2	6.1
137	O	5.3	7.2	7.4	7.6	6.8		6.0	6.0	6.0	6.8	6.5	6.1	5.9
	G	5.2	6.9	6.8		6.8		5.8	5.5	5.3	5.5	5.5	5.4	5.6
350	O	5.8	7.5	7.15	7.1	6.9	6.8		6.4	6.1	6.3	6.0	5.9	6.0
	G	5.8	7.7	6.6	6.4	6.6	6.3		5.4	5.2	5.4	5.0	4.9	4.7
379	O	5.7	8.0	7.8	7.8	7.5	7.6	7.4	7.0	6.5	6.6	6.5	6.3	6.5
	G	5.7	8.0	7.9	8.2	7.9	8.0	7.2	7.4	6.8	6.6	6.1	6.2	6.5
472	O	5.0	5.6	5.4	4.6	3.0	2.0	1.4	0.5					
	G	5.0	5.8	5.3	4.9	4.5	3.3	2.0	0.3					
472	O	5.8	7.0	7.0	7.3	7.3	7.2	7.0	6.5	6.7	6.7	6.0	6.0	6.5
	G	5.8	6.1	6.0	6.0	NE	5.7	5.7	5.3	5.7	5.7	5.3	5.0	5.0
913	O	5.2	7.3	7.5	7.3	7.2	7.2	7.0	6.9	6.7	6.5	6.4	5.8	6.0
	G	5.2	7.5	7.8	7.6	7.5	7.4	7.0	6.5	6.1	5.6	5.4	5.4	5.4
1143	O	5.8	7.8	7.8	7.5		6.8	8.1	7.9	7.8	7.2	6.8	6.8	6.5
	G	5.8	7.8	7.9	8.0		7.9	7.7	7.6	7.5	7.4	7.3	6.9	6.8
1173	O	5.0	4.7	4.4	4.0	4.9	4.3	4.0	3.7	3.0	2.3	1.9	2.0	1.8
	G	5.0	4.9	4.3	4.2	3.7	3.0	3.0	2.6	2.6	2.2	2.4	1.8	1.8
1183	O	5.3	7.9	7.9	7.2	7.2	7.2	7.3	7.5	7.7	7.8	8.0	7.7	7.5
	G	5.3	7.8	8.3	7.6	8.0	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.4	8.0	7.8

Temperatura de incubación: 37°C. A: aceite empleado en la preparación de las mayonesas; O: oliva; G: girasol. NE: no estudiado.

Tabla RM5: Comparación de la enterotoxina cuantificada por el método ELISA (ng/100 g) producida por cada cepa a lo largo de 14 días de incubación en mayonesas.

Cepa	A	pH	EET	Periodo de incubación			
				4	7	11	14
S6	O	5.3	EEB	0 (7.3)	0 (7.9)	2.32 (7.4)	4.71 (7.4)
	G	5.2	EEB	0 (7.0)	4.0 (7.2)	0 (7.3)	0 (7.1)
100	O	5.2	EEA	35.7 (7.4)	180.0 (7.2)	NE (7.0)	42.0 (7.3)
	G	5.15	EEA	37.8 (7.2)	45.5 (7.2)	NE (6.4)	29.3 (7.1)
137	O	5.3	EEC	8.28 (7.5)	7.56 (7.4)	20.0 (7.0)	17.1 (7.2)
	G	5.2	EEC	4.4 (7.5)	12.5 (6.5)	20.0 (6.7)	0.36 (6.2)
350	O	5.8	EEB	30.0 (7.4)	64.8 (7.1)	29.9 (7.0)	48.7 (6.9)
	G	5.8	EEB	5.4 (7.1)	62.9 (6.8)	17.0 (6.8)	65.0 (6.7)
379	O	5.7	EEB	0 (7.8)	0 (7.8)	0 (7.9)	0 (7.8)
	G	5.7	EEB	0 (8.0)	0 (7.9)	0 (8.0)	0 (8.0)
472	O	5.0	EED	0 (5.6)	0 (4.3)	0 (3.1)	(2.3)
	G	5.0	EED	0 (5.4)	0 (4.7)	0 (4.1)	(2.0)
472	O	5.8	EED	15.68 (7.2)	22.0 (7.1)	20.0 (7.3)	26.1 (7.2)
	G	5.8	EED	NE	NE	NE	NE
913	O	5.2	EEA	0 (7.5)	0 (7.3)	0 (7.6)	0 (7.2)
			EEC	0	0	0	42.1
	G	5.2	EEA	6.3 (7.5)	0 (7.6)	0 (7.8)	0 (7.6)
			EEC	7.5	0	0	66.0
1143	O	5.8	EEC	110.0 (7.8)	96.0 (7.6)	NE	4.3 (7.9)
	G	5.8	EEC	84.0 (8.3)	129.5 (8.1)	NE	140.0 (8.0)
1173	O	5.0	EEB	NE	0 (3.2)	NE	NE
	G	5.0	EEB	0 (3.4)	0 (4.3)	0 (2.4)	0 (4.2)
1183	O	5.3	EEC	1.72 (7.8)	2.0 (7.4)	2.99 (7.6)	1.68 (7.6)
	G	5.0	EEC	10.62 (8.4)	0 (8.3)	1.65 (7.7)	1.74 (8.3)

Temperatura de incubación: 37°C. Los valores entre paréntesis indican la media del logaritmo de UFC/g.

A: aceite empleado en la preparación de las mayonesas; O: oliva; G: girasol. EET: enterotoxina producida; NE: no estudiado.

Tabla RM6: Comparación de la enterotoxina cuantificada por el método ELISA (ng/100 g) producida por cada cepa a lo largo de 7 días de incubación a cuatro temperaturas diferentes en mayonesas.

Cepa	A	pH	EET	Temperatura de incubación (°C)			
				22	28	37	44
S6	O	5.3	EEB	9.7 (7.7)	21.8 (7.7)	0 (7.9)	19.32 (6.5)
	G	5.2	EEB	8.5 (7.2)	15.42 (7.1)	4.0 (7.2)	35.0 (6.3)
100	O	5.2	EEA	20.0 (7.7)	45.6 (7.1)	180.0 (7.2)	43.2 (6.6)
	G	5.15	EEA	1.33 (7.3)	56.4 (6.9)	45.5 (7.2)	25.2 (6.1)
137	O	5.3	EEC	0.28 (7.8)	4.12 (7.5)	7.56 (7.4)	8.58 (7.0)
	G	5.2	EEC	5.5 (7.5)	5.9 (7.2)	12.5 (6.5)	29.2 (7.2)
350	O	5.8	EEB	10.6 (7.4)	29.5 (7.4)	64.8 (7.1)	0.48 (6.8)
	G	5.8	EEB	63.4 (7.4)	39.2 (7.2)	62.9 (6.8)	53.6 (6.2)
379	O	5.7	EEB	0 (7.9)	82.8 (8.2)	0 (7.8)	1.69 (6.4)
	G	5.7	EEB	0 (7.9)	39.2 (7.8)	0 (7.9)	0 (6.6)
472	O	5.0	EED	0 (5.6)	0 (5.7)	0 (4.3)	0 (1.5)
	G	5.0	EED	0 (5.2)	59.9 (5.7)	0 (4.7)	29.75 (5.6)
472	O	5.8	EED	28.2 (7.4)	10.23 (7.2)	22.0 (7.1)	33.0 (6.8)
	G	5.8	EED	(6.4)	17.1 (6.4)	42.9 (6.1)	24.7 (5.4)
913	O	5.2	EEA	0 (7.8)	0 (7.9)	0 (7.3)	0 (6.4)
	G	5.2	EEC	63.0	165.0	0	63.0
			EEA	0 (7.9)	0 (8.1)	0 (7.6)	0 (6.6)
			EEC	0	0	0	0
1143	O	5.8	EEC	100.0 (8.1)	120.0 (8.1)	96.0 (7.6)	96.0 (7.3)
	G	5.8	EEC	70.0 (8.1)	128.0 (8.1)	29.5 (8.1)	200.0 (7.8)
1173	O	5.0	EEB	0 (5.2)	9.22 (4.4)	0 (3.2)	0 (3.0)
	G	5.0	EEB	6.45 (4.9)	16.8 (4.9)	0 (4.3)	0 (0.0)
1183	O	5.3	EEC	0 (7.9)	7.44 (8.1)	2.0 (7.4)	6.5 (7.3)
	G	5.0	EEC	0 (8.3)	19.5 (8.5)	0 (8.3)	18.48 (7.2)

Tiempo de incubación: 7 días. Los valores entre paréntesis indican la media del logaritmo de UFC/g.

A: aceite empleado en la preparación de las mayonesas; O: oliva; G: girasol. EET: enterotoxina producida.

Tabla RM7: Valores expresados en tanto por ciento con respecto al máximo de enterotoxina detectada en los distintos periodos de incubación y a las diferentes temperaturas secretadas por cada cepa.

Cepa	A	pH	Días de incubación(37°C)				Temperatura de incubación			
			4	7	11	14	(7 días)			
							22°C	28°C	37°C	44°C
56	O	5.3	0	0	49.2	100	44.5	100	0	88.6
	G	5.2	0	100	0	0	24.3	44.0	11.4	100
100	O	5.2	19.8	100	NE	23.3	11.1	25.3	100	24.0
	G	5.15	83.1	100	NE	64.4	23.6	100	80.7	44.7
137	O	5.3	41.4	37.8	100	85.5	3.2	48.0	88.1	100
	G	5.2	22.0	62.5	100	0.18	18.8	20.2	42.8	100
350	O	5.8	46.3	100	46.1	75.2	16.3	45.5	100	0.7
	G	5.8	12.0	96.8	26.2	100	100	61.8	99.2	84.5
379	O	5.7	0	0	0	0	0	100	0	2.0
	G	5.7	0	0	0	0	0	100	0	0
472	O	5.0	0	0	0	100	0	0	0	0
	G	5.0	0	0	0	100	0	100	0	49.6
472	O	5.8	60.1	84.3	76.6	100	85.4	31.0	66.6	100
	G	5.8	NE	NE	NE	NE	NE	39.9	100	57.5
913	O	5.2(1)	0	0	0	0	0	0	0	0
		(2)	0	0	0	100	38.2	100	0	38.2
	G	5.2(1)	100	0	0	0	0	0	0	0
		(2)	11.4	0	0	100	0	0	0	0
1143	O	5.8	100	87.3	NE	3.9	83.3	100	80.0	80.0
	G	5.8	60.0	92.5	NE	100	35.5	64.0	64.7	100
1173	O	5.0	NE	NE	NE	NE	0	100	0	0
	G	5.0	0	0	0	0	38.4	100	0	0
1183	O	5.3	57.5	66.9	100	56.2	0	100	26.9	87.3
	G	5.3	100	0	15.5	16.4	0	100	0	94.7

(1): EEA; (2): EEB; NE: no estudiado; A: aceite empleado en la preparación de las mayonesas; O: oliva; G: girasol.

Tabla RI18 : Comparación del valor de pH final obtenido de forma global independientemente de la cepa de esta-
filococos inoculada, en mayonesas preparadas con los distintos valores de pH iniciales, registrado
en cada temperatura de incubación estudiada.

pH o	22°C		28°C		37°C		44°C	
	O	G	O	G	O	G	O	G
4.0						4.3 (0.0)		
4.5			NE (0.0)		NE (0.3)	4.5 (0.3)	NE (0.0)	
4.8						4.52 (1.6)		
4.9			NE (0.0)		NE (0.8)	4.4 (4.4)	NE (0.0)	
5.0	4.1 (5.4)	4.6 (6.1)	4.3 (5.0)	4.1 (6.3)	4.33 (3.8)	4.3 (5.2)	4.3 (1.7)	4.3 (4.2)
5.1						5.2 (5.7)		
5.15		5.1 (7.3)		5.0 (6.9)		4.95 (6.9)		5.0 (6.1)
5.2	4.7 (7.7)	4.5 (7.5)	4.5 (7.5)	4.47 (7.3)	4.72 (7.0)	4.6 (6.9)	4.5 (6.5)	4.6 (6.7)
5.25						5.4 (7.5)		
5.3	4.6 (7.8)		4.6 (7.7)		4.62 (7.4)		4.4 (6.9)	
5.5		NE (6.5)		NE (4.4)	6.4 (6.5)	5.2 (6.6)		NE (5.3)
5.6					5.0 (7.8)	5.2 (6.6)		
5.7	4.3 (7.9)	4.6 (7.9)	4.5 (8.2)	4.35 (7.8)	4.51 (7.8)	4.56 (7.9)	4.6 (6.4)	4.6 (6.6)
5.8	4.7 (7.6)	4.9 (7.3)	4.9 (7.5)	5.1 (7.2)	4.92 (7.2)	4.82 (7.2)	4.8 (7.0)	4.8 (6.4)

pHo: pHinicial; O: mayonesas preparadas con aceite de oliva; G: mayonesas preparadas con aceite de girasol. El
valor entre paréntesis expresa la media del logaritmo de UFC/g registrados, mientras que el inmediatamente an-

Tabla RM9 : Comparación del valor del logaritmo de UFC/g registradas diariamente a lo largo de 7 días de incubación con distintos valores de pH, independientemente del aceite utilizado.

pHo	Días de incubación				
	3	4	5	6	7
4.5	0.42	0.41	0.22	0.15	0
4.8	4.7	3.5	2.6	0	0
4.9	2.7	3.45	1.35	0.33	0.35
5.0	5.14	4.44	4.23	2.65	1.42
5.15			6.6	6.93	7.31
5.2	6.53	6.56	6.64	6.5	5.92
5.3	7.61	7.93	7.4	7.26	7.82
5.5	6.6	6.83	6.46	6.4	5.96
5.6	6.4	6.4	7.32	7.02	7.07
5.7	7.98	7.87	7.97	7.73	7.77
5.8	7.47	7.21	7.18	7.21	6.84

Temperatura de incubación: 37°C. Inóculo: 100.000 UFC/g

Tabla RM40: Periodo de tiempo (expresado en días) en que el recuento de estafilococos alcanza 10^6 y 10^7 UFC/ g en mayonesas. Concentración de inóculo: 100.000 UFC/g

Cepa	pH	O		G	
		10^6	10^7	10^6	10^7
S6	5.2 / 5.3	1.5	3	2	4.5
100	5.15 / 5.2	3	5	4	6
137	5.2 / 5.3	1.5	3	1.5	3
350	5.8 / 5.8	1	2.5	1	2.5
379	5.7 / 5.7	1	1.5	1	1.5
472	5.0 / 5.0	!	!	!	!
472	5.8 / 5.8	1.5	3	3	
913	5.2 / 5.2	1	2.5	1	2.5
1143	5.8 / 5.8	1	2	1	2
1173	5.0 / 5.0	!	!	!	!
1183	5.3 / 5.0	1	2	1	2



b: pH de las mayonesas preparadas con aceite de girasol.
a: pH de las mayonesas preparadas con aceite de oliva.

O: mayonesas preparadas con aceite de oliva; G: mayonesas preparadas con aceite de girasol; !: el recuento no alcanzó el valor indicado durante el periodo de incubación.

recuento en placa -FDA- y agar de Baird-Parker -BP-), lo que viene demostrado por el tratamiento estadístico de "comparación de medias". Todos los valores expresan la media estadística de las UFC/g habidos en ambos medios.

La producción de enterotoxina se señala en las tablas RM5, RM6. La relación de cepas que secretan cada una de las enterotoxinas, así como la media de enterotoxina detectada (ng/100g) se detallan a continuación:

Enterotoxina	Cepas	Media de producción (ng/100g de mayonesa)
- EEA	100, 913	28.6
- EEB	56, 350, 379, 1173	15.0
- EEC	137, 913, 1143, 1183	36.5
- EED	472	16.6

La cantidad máxima registrada (200 ng/100 g) ha correspondido a la cepa 1143 preparada con aceite de girasol e incubada a 44°C durante 7 días.

Es de destacar la presencia de enterotoxina cuando la media del logaritmo de UFC/g fue de 4.3 (2×10^4) (cepa 472 inoculada en mayonesas preparadas con aceite de oliva e incubadas a 37°C durante 14 días) y de 4.4 (2.5×10^4) (cepa 1173 inoculada en mayonesas preparadas con aceite de oliva e incubadas a 26°C durante 7 días). En estos tres casos el

valor inicial de pH fue de 5.0.

Análisis de la producción de enterotoxina de forma individual en cada cepa

a) Cepas que producen enterotoxina A (EEA)

- + 100: producción moderadamente alta, excepto a 22°C, especialmente en mayonesas preparadas con aceite de girasol.
- + 913: no se detectó enterotoxina de tipo A en ninguna mayonesa excepto en aquellas que se mantuvieron cuatro días en incubación, a pesar de que los valores de pH permitieron un desarrollo abundante de los microorganismos. Sin embargo sí que se secretaron cantidades elevadas de EEC a todas las temperaturas menos a 37°C.

b) Cepas que producen enterotoxina B (EEB).

- + 56: no se detectó enterotoxina producida tras siete días de incubación a 37°C en mayonesas preparadas con aceite de oliva, mientras que la cantidad registrada en las de aceite de girasol fue baja. No obstante, se empezó a observar a los 11 días de incubación, siendo la máxima cuantificada a los 14 días en mayonesas preparadas con aceite de oliva. Por el contrario en aquellas preparadas con aceite

de girasol sólo se detectó a los 7 días.

+ 350: la cepa más productora de enterotoxina B en mayonesas. La EEB secretada a 44°C en mayonesas preparadas con aceite de oliva fue casi despreciable.

+ 379: A 28°C se detectaron cantidades importantes de enterotoxina, especialmente en las mayonesas preparadas con aceite de oliva. A ninguna otra temperatura de incubación pudo observarse la presencia de EEB, excepto a 44°C, donde fue escasa.

+ 1173: El pH ácido al que las mayonesas inoculadas con esta cepa fueron preparadas impidió la comparación en términos de producción, ya que no se produjo un crecimiento suficiente. No obstante, es de señalar que se detectó la presencia de enterotoxina a 28°C cuando la media del logaritmo de UFC/g fue de 4.4 y 4.9 en mayonesas preparadas con aceite de oliva y de girasol, respectivamente. También se constató la presencia de EEB a 22°C en mayonesas preparadas con aceite de girasol cuando la media de las UFC fue ligeramente inferior a 100.000/g.

c) Cepas que producen enterotoxina C (EEC).

En términos globales, aquí se incluyen las cepas más

productoras.

- + 137: producción moderada en general, excepto tras 14 días de incubación a 37°C en mayonesas preparadas con aceite de girasol, donde se registró una cantidad escasa de producción.

- + 913: única cepa bi-productora estudiada. Se detectó mayor cantidad de EEC que de EEA. A 28°C la cantidad registrada fue muy elevada en las mayonesas preparadas con aceite de oliva, donde la secreción fue apreciable en todas las temperaturas, excepto a 37°C (sólo detectable tras 14 días de incubación). Por el contrario, la producción en mayonesas preparadas con aceite de girasol fue muy inferior, siendo nula a todas las temperaturas, en periodos de tiempo inferiores o iguales a 7 días, registrándose sólo a 37°C tras 14 días de incubación.

- + 1143: la cepa más productora de las estudiadas. Se detectaron cantidades elevadas de EEC en todo momento, excepto tras 14 días a 37°C.

- + 1185: cepa poco productora, a pesar de registrarse valores elevados de recuento. A 22°C no se pudo detectar producción.

d) Cepas que producen enterotoxina D (EED).

- + 472: Única cepa estudiada que produce esta enterotoxina. A 37° C sólo se registró producción tras 14 días de incubación en aquellas mayonesas preparadas tanto con aceite de oliva como de girasol, cuyo pH inicial fue de 5.0. En un valor de pH de 5.8 la producción fue moderada.

B.1. INFLUENCIA DEL pH DE LA MAYONESA

El pH es uno de los parámetros que afectan de forma más notoria el crecimiento de los estafilococos en la mayonesa. En general, se puede apreciar una gran diferencia entre aquellas mayonesas preparadas a un pH superior o igual a 5.1, y aquellas cuyo pH era de 5.0 ó inferior. Esta diferencia viene expresada en términos estadísticos por la "comparación de dos medias" y se ha establecido en 14.64, valor muy superior a 2.6 que representaría diferencias significativas en un intervalo de confianza del 99%.

La representación gráfica a nivel general de las modificaciones en los valores de los recuentos tal y como se afectan por las variaciones de pH vienen expresados en la figura RM28, en la cual se observa como la media de los logaritmos de las UFC/g habidas en el total de días de incubación se mantiene por debajo de 2 cuando el pH osciló entre 4 y 4.9. A pH 5.0 la media del logaritmo fue de 4.89, mientras que ya a pH 5.1 esta fue de 5.7. El crecimiento

máximo registrado fue a pH 5.7 (5.1×10^7).

La influencia que este parámetro ejerce sobre el desarrollo de las distintas cepas de *S. aureus* se expresa en las figuras RM6, RM7, RM12, RM13, RM15 y RM27.

Es de señalar que las diferencias observadas a valores de pH superiores o iguales a 5.1 no son en ningún modo significativas, y tal como se aprecia en la mayoría de los casos, las representaciones gráficas son superponibles.

En ninguna de las cepas en las que se analizó el crecimiento a valores de pH de 4.0 se pudo detectar ninguna célula con actividad vital. Este hecho se repitió cuando se estudió a pH 4.5, excepción hecha de la cepa 137 inoculada en mayonesas preparadas con aceite de girasol, donde se contabilizaron de 1000 a 5000 UFC/g todavía en el día 5, pero no en el día 6; así como de la 179 inoculada en mayonesa preparada con aceite de oliva.

En el intervalo de pH comprendido entre 4.2 y 5.0, ambos inclusive, se pudieron detectar células capaces de desarrollar colonias en todas las cepas donde esto se estudió, si bien el número de unidades formadoras de colonias iniciales no se vio en ningún momento incrementado. Incluso en las mayonesas preparadas con aceite de girasol con un valor de pH de 4.5 contaminadas con la cepa 50 no se pudo en ningún momento registrar alguna UFC/g. En las figuras RM29 se

representan las medias de los valores globales registrados en cada día en cada valor de pH, sin considerar la cepa de *S. aureus* que originó dicho crecimiento. Por lo general, los valores de recuento van descendiendo progresivamente hasta que en el cuarto o quinto día sólo se contabilizan de 100 a 1000 UFC/g.

Hay que destacar el hecho de que con un valor de pH de 5.5 el crecimiento en todas las muestras examinadas experimentó un descenso con respecto a otros valores de pH próximos (5.3 y 5.7). Esta circunstancia se puso de manifiesto con mayonesas preparadas con aceite tanto de oliva como de girasol, con las dos cepas en las que se examinó dicho fenómeno (137 y 379) y a las cuatro temperaturas experimentales.

Así mismo, parece haber una clara dependencia entre el tipo de aceite empleado en la fabricación de la mayonesa y el valor de pH que permite el crecimiento y multiplicación de los estafilococos. En la tabla RM2 se expresa como a valores de pH inferiores o iguales a 5.0 y en todas las temperaturas, las mayores cifras de recuento se registraron en las mayonesas preparadas con aceite de girasol.

En cuanto a las relaciones entre el pH y otros parámetros, en la cepa 379 donde se estudió el efecto combinado del pH inferior a 5.0 y de la temperatura se pudo establecer que sólo se detectaban células viables cuando la temperatura era de 37 °C, pero no de 22, 28 ó 44 °C. No obstante, esta

relación sólo tiene lugar en este valor de pH.

El valor del inóculo inicial no parece representar una gran influencia sobre las cifras de recuento registradas, como parece demostrar la cinética del desarrollo en la cepa 472 (figura RM14), en la cual se determinó cómo se veían estos valores afectados por un inóculo inicial de 50.000 y de 100.000 UFC/g.

La producción de enterotoxinas (RMS, Sng) fue nula cuando el valor de pH inicial se ajustó a 4.9 ó inferior. Cuando el pH inicial fue de 5.0, la cantidad registrada fue muy escasa, debido principalmente a la falta de crecimiento, excepto en la cepa 472 a 28 y a 44°C en mayonesas preparadas con aceite de girasol. Sin embargo, no se pudo detectar EED en aquellas mayonesas preparadas con aceite de oliva a pesar de que la media de las UFC/g fue similar.

Al comparar la media de la enterotoxina producida en los dos valores de pH inicial con los que fueron preparados las mayonesas inoculadas con la cepa 472 se observa que la producción fue superior en el valor más elevado de pH, si bien esto pudiera reflejar un crecimiento más significativo.

	5.0	5.2
Oliva	4.05	22.2
Girasol	10.0	15.2

Es conveniente resaltar que tras siete días de incubación a 28 °C en mayonesas preparadas con aceite de girasol, la cantidad media de EED producida fue de 59.9 ng/g cuando el pH inicial fue de 5.0, donde el logaritmo de UFC/g fue de 5.7, mientras que el valor correspondiente a pH inicial de 5.8 fue de 17.1 ng/g, siendo la media de UFC/g de 2.5×10^6 .

En la cepa 1173 (pH 5.0), al igual que en la 472, no se registró enterotoxina presente tras 7 días de incubación a 37° C, pero sí a 28 °C en ambos tipos de mayonesa, y a 22°C en aquellas preparadas con aceite de girasol, aunque el crecimiento observado se mantuvo siempre inferior a 100.000 UFC/g. No se pudo detectar enterotoxina de ninguno de los dos tipos (EEA ó EEC) cuando las muestras eran incubadas a 37 ni a 44 °C, ni tan siquiera tras 14 días de incubación en el primero.

En cuanto a la producción de enterotoxina en relación con el pH y la temperatura de incubación, cuando el valor de pH inicial fue de 5.0, sólo se detectó producción a 28°C y a 44° C, siendo la síntesis en esta segunda temperatura muy inferior a la primera. En igualdad o superioridad de crecimiento apenas se pudo detectar enterotoxina alguna a 22° C.

B.2. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION

En las figuras RM16, RM17, RM18, RM19, RM15, RM20, RM21, RM22, RM23, RM24, RM25 y RM26 se representa la influencia que ejerce este parámetro sobre el desarrollo de las distintas cepas de *Staphylococcus aureus*. Igualmente, en la tabla RM1 se expresa el valor medio obtenido en ambos medios de recuento y a lo largo de siete días de incubación de los recuentos habidos, estableciendo comparaciones entre las mayonesas preparadas con los dos tipos de aceite y sometiénolas a las distintas temperaturas de incubación. Tal como se aprecia en dicha tabla, el crecimiento más pobre que se registró fue a 44°C, excepto en los casos de 137-G y 472-G, pH 5.0 (siendo incluso muy superior al registrado a 37°C y ligeramente inferior al observado a 28°C) y en 379-G, pH 5.5 (donde alcanzó un recuento superior a 28°C pero inferior a 37°C). Es de señalar que en los tres casos se trataba de mayonesas preparadas con aceite de girasol.

El valor medio global más alto ha correspondido a 22°C (7.3 y 7.08 para las mayonesas preparadas con aceite de oliva y de girasol respectivamente), si bien en varias cepas, el desarrollo fue superior a 23 que a 22°C (S6, 472-G, 913, 1143-G, 1183, 379-0) (figura RM27).

Sólo la cepa S6, en las mayonesas preparadas con aceite de oliva, manifestó un crecimiento óptimo a 37°C. En todos los demás casos ha ocupado un segundo (5/23), un tercer (15/23) e incluso un cuarto lugar (2/23). Las cepas que exhibieron un recuento inferior a 37°C fueron 137-G y 472-G, pH 5.0.

Los valores medios globales, indistintamente del crecimiento habido en cada una de las cepas, se representan en la figura RM27, la cual viene a confirmar lo anteriormente expuesto: el crecimiento más elevado se produjo a 22°C en aquellas mayonesas preparadas con aceite de oliva, seguida de las preparadas con el mismo aceite e incubadas a 26°C. El crecimiento en las mayonesas preparadas con aceite de girasol siempre fue inferior, al considerar la misma temperatura que las preparadas con aceite de oliva, si bien, individualmente, en las cepas S6, 137-G, 379, pH 5.7, 913, 1143, 1173 y 1183 se registraron valores superiores en las preparadas con aceite de girasol, al menos en alguna temperatura.

En cuanto a la cinética de la reproducción a distintas temperaturas, a 44°C se alcanzan antes los valores máximos de recuento, pero también empiezan a descender antes que a las otras temperaturas. En contraposición, a 22°C el crecimiento es más prolongado y más uniforme, lo que podría justificar que la media global fuera superior en esta temperatura.

La relación entre la temperatura y el valor de pH vienen expresados en la tabla SM3. Tal y como se expuso más arriba, a valores de pH inferiores a 5.0 la única temperatura que permitió la detección de células con actividad vital fue 37°C.

En las cuatro temperaturas estudiadas se observó la

producción de enterotoxina. Los valores máximos detectados en cada temperatura se expresan de forma resaltada en la tabla RM6. Tal y como se aprecia en dicha tabla, a 22°C la cantidad máxima fue sintetizada por la cepa 1143 (EED), cepa muy productora en términos generales; a 28°C fue la cepa 913 la que secretó mayor cantidad, lo que es sorprendente, dado el bajo índice de secreción de dicha cepa en otras circunstancias. A 37°C fue la cepa 100 la que mostró una producción más elevada (180.0 ng/100 g), mientras que a 44°C se detectó mayor cantidad de enterotoxina en las mayonesas inoculadas con la cepa 1143.

En la tabla RM7 se expresa el porcentaje de producción con respecto al máximo habido para una misma cepa y aceite. La temperatura óptima donde se detectó el valor máximo de producción correspondió a 28°C (61.65%), mientras que la peor se estableció en 22°C (22.7%), correspondiendo 35.85% y 46% a los porcentajes para 37 y 44°C, respectivamente.

No fue posible detectar enterotoxina presente en mayonesas incubadas a 22°C inoculadas con diversas cepas: 379, 472 pH 5.0, 1183, 913 y 1173-0.

De igual forma, tampoco se pudo detectar enterotoxina cuando la incubación se realizó a 28°C en mayonesas inoculadas con las cepas 472-0 pH 5.0, 913-0 (aunque cuando el aceite era de girasol, la cantidad detectada fuera muy elevada). Se observó un máximo de producción en las cepas 379, 472-G pH 5.0, 1173,

1183, S6-0, 100-G, 913-G y 1143-0.

A 37 °C la producción no fue muy elevada, siendo la temperatura óptima para las cepas 100-0, 350, 472-G pH 5.8. No se registró secreción en las cepas 379, 472 pH 5.0 (hasta el día 14), 913, 1173. En términos generales no es una temperatura en la que la EEB se sintetice de forma notable.

Cuando la temperatura de incubación fue de 44°C no se detectó la presencia de enterotoxina en las cepas 379, 472-0 pH 5.0, 913-0 y 1173; aunque fue máxima en los casos de 137, S6-G, 472-0 pH 5.8 y 1143-G.

B.3. INFLUENCIA DEL TIPO DE ACEITE UTILIZADO EN LA PREPARACION DE LAS MAYONESAS

El tratamiento de "comparación de dos medias" demuestra que no existe diferencia estadística entre los valores de recuento habidos en las mayonesas preparadas con ambos tipos de aceite ($t=1.064$). No obstante y como ya se ha mencionado con anterioridad sí que existe diferencia cuando el pH era inferior o igual a 5.0 (tabla RM2). Esta desigualdad de crecimiento es más manifiesta en los valores de pH de 5.0 y 4.9. En el primero se aprecia cómo la diferencia entre la media de las UFC/g registradas en mayonesas preparadas con uno y otro aceites y contaminadas con las cepas 472, 1173 y 1183 oscila entre 0.7 (a 22°C) y 2.5 unidades logarítmicas a

44°C), siendo de 1.3 y 1.4 a 28 y 37°C, respectivamente.

Con un pH de 4.9 esta diferencia es aún más llamativa puesto que en las mayonesas preparadas con aceite de girasol el valor medio de UFC/g registrado fue de 4.4 y en las de aceite de oliva de 0.8 (cepas 137, 326, 379, 472 y S6).

La ausencia de diferencia estadística entre las mayonesas preparadas con ambos tipos de aceite también se manifiesta en cuanto a la síntesis y detección de enterotoxina. Así, el tratamiento estadístico de "comparación de dos medias" arroja un resultado de $t = 1.23$, inferior a 2.0 que indicaría que la diferencia era significativa en un intervalo de confianza del 95%. La media de la producción en las mayonesas preparadas con aceite de girasol ha sido de 33.1 ng/100 g, mientras que cuando el aceite era de oliva dicho valor correspondía a 22.5 ng/100 g.

S.4. INFLUENCIA DEL INÓCULO INICIAL

Sólo en la cepa 472 se estudió cómo afectaba el inóculo inicial el desarrollo posterior de los microorganismos en cuanto a nivel de multiplicación se refería. La figura RM15 muestra como esta influencia es prácticamente despreciable, ya que los valores de recuento a los pH estudiados son casi idénticos para los inóculos iniciales de 10.000 y 50.000 que los recogidos en aquellas mayonesas donde éste era de

100.000.

Esta misma ausencia de diferencia se manifiesta en la cantidad de enterotoxina producida, ya que en la cepa 472 se registró 18.0 ng/100 g con un inóculo de 10.000, 22.0 ng/100 g cuando el inóculo inicial fue de 50.000, mientras que cuando éste fue de 100.000 la cantidad correspondiente fue de 20.0 ng/100 g.

B.5. EVOLUCION DEL DESARROLLO DE LAS DISTINTAS CEPAS

De las figuras RM1 a RM11 y de la tabla RM4 se desprende que, por lo general, en todas las cepas se produjo un incremento gradual del número de UFC/g en los tres a seis primeros días de incubación, registrándose casi siempre el valor máximo de recuento en este periodo. Cabe mencionar a este respecto la cepa 100 donde no se alcanzó la cifra máxima de recuento hasta el día 7 en mayonesas preparadas con aceite de girasol (pH inicial 5.15) y hasta el día 10 en mayonesas preparadas con aceite de oliva, así como la 1143 inoculada en mayonesas preparadas con aceite de oliva, cuya cifra máxima de recuento (100 millones) se obtuvo en el día 8.

Una vez alcanzado este valor máximo de UFC/g la cifra se mantuvo estable durante dos o tres días para descender a continuación de forma paulatina. No obstante, en la cepa 1137, si bien descendió el recuento desde el día 3 hasta el

5, se registró un nuevo aumento del número de células viables, obteniéndose otro máximo en el día 12 en las mayonesas preparadas con ambos tipos de aceite.

La producción de enterotoxina detectable a lo largo de 14 días, tomando como referencia los días 4, 7, 11 y 14, se expresa en la tabla RM5. Por lo general, la cantidad de enterotoxina detectada incrementa progresivamente, aunque algunas cepas tardaron más en producir (472 y 913, si bien éstas fueron inoculadas en mayonesas con una fuerte acidez). Una vez alcanzado el valor máximo, éste descendió gradualmente en las cepas siguientes, expresando entre paréntesis el tipo de aceite utilizado en su preparación:

- 100 (O)
- 100 (G)
- 56 (G)
- 137 (G)
- 350 (O)
- 350 (G)
- 913 (G)
- 1183 (O)

Por el contrario, en otras cepas, tras detectarse una cantidad elevada de enterotoxina en los primeros días de incubación, ésta se vio reducida de forma más o menos drástica para incrementar de nuevo hacia el final del periodo de incubación, siguiendo un modelo de curva bifásica. Las cepas que así se comportaron se detallan a continuación:

- 350 (O)
- 472 (O) pH 5.8
- 1183 (G)

En la tabla RM7 se muestra la relación en términos de porcentaje de enterotoxina detectada tras cada uno de los periodos de incubación, a fin de poder realizar un estudio comparativo de la producción en un lapso de tiempo. Tras cuatro días de incubación se detectó el 32.4%, mientras que para 7 días esta cifra correspondió a 42.2%. Tras 11 días el valor global fue de 28.5%, observándose que tras 14 días la cifra era la máxima (51.14%). En términos generales, esto viene a indicar que tras 4 días ya hay una gran producción, que incrementa hasta el día 7 para descender durante los cuatro días siguientes y alcanzar un valor máximo en el día 14.

En ninguna de las muestras incubadas durante 1 día a 37°C se apreció presencia de enterotoxina, aunque las cifras de recuento fueron elevadas.

B.6. VARIACIONES DEL pH DE LAS MUESTRAS

El tratamiento estadístico utilizado de "comparación de dos medias" confirmó el hecho de que la diferencia entre el pH inicial de la mayonesa y el final registrado en el momento en que se realizaba la extracción era altamente significativa

($t=12.4$) dentro de los límites de confianza del 99%.

El valor de pH final sufrió un incremento en 4.2% de las muestras, que se detallan a continuación, expresando en primer término la cepa, en segundo el número de muestra, en tercero entre paréntesis el tipo de aceite utilizado en su preparación, en cuarto la temperatura (°C) y el tiempo (días) de incubación y en último el pH inicial al que fue preparada la mayonesa.

- S6 -12 (G)	37	7	4.5
- 100-23 (G)	37	4	5.15
- 137-10 (O)	37	7	5.5
- 137-11 (S)	37	7	5.25
- 137-09 (O)	37	7	5.2
- 326-12 (G)	37	7	4.0
- 326-11 (G)	37	7	4.8
- 472-11 (G)	37	7	4.0
- 1163-03 (G)	22	7	5.0

El valor medio de la diferencia entre el pH inicial y el pH final ha sido de 0.7. No se ha podido constatar de forma fehaciente que existiera una relación inequívoca entre el crecimiento y el valor final de pH ya que aquellas muestras en las que el crecimiento se hacía manifestado más exuberante no fueron las que presentaron un valor de pH final más bajo ni viceversa. Sin embargo sí que se pudo apreciar que éste era en cierto modo dependiente de la temperatura.

tal y como figura en la tabla RM3, en la que se expresan los valores finales de pH en relación con el tiempo de incubación y con la temperatura. Tal y como vemos en dicha tabla el menor valor final de pH coincidió en cada cepa con mayor frecuencia con las muestras que habían sido incubadas a 44°C (14 de 22), mientras que este dato para 22°C fue de 6 de 22, para 26 fue de 6 de 22, y para 37 de 2 de 20.

Así mismo, en relación con el tiempo de incubación los datos están representados en la misma tabla. También parece haber una dependencia entre el tiempo que se mantuvieron las muestras en incubación y el pH final registrado ya que el porcentaje respectivo de frecuencia de pH mínimo para aquellas muestras incubadas durante 11 y 14 días fue de 50% y de 35.8%, mientras que para los días 4 y 7 fue de 5.3 y 9.5% respectivamente.

En cuanto los valores máximos finales registrados en relación tanto con el tiempo como con la temperatura de incubación éstos vienen expresados igualmente en dicha tabla. La relación entre periodo de incubación-pH final es manifiesta, manteniéndose valores más similares a los iniciales en 55.1% de las muestras mantenidas 4 días, y porcentajes muy inferiores en el resto. Sin embargo no es tan clara la influencia de la temperatura, observándose valores de frecuencia muy similares en todas ellas.

El valor final máximo absoluto ha sido de 5.8, en la muestra

472-29/M, preparada con aceite de oliva e inoculada con 100.000 UFC/g, que fue incubada a 37°C durante 14 días. También es de señalar el valor 5.5, registrado en la muestra 1183-03/M, mayonesa preparada con aceite de girasol, con un valor de pH inicial de 5.0, inoculada con 100.000 UFC/g y mantenida durante siete días en incubación a 22°C.

Por el contrario, los valores mínimos computados han correspondido a las muestras 1173-12/M y 472-32/M (3.8 y 3.9 respectivamente), ambas con un valor inicial de pH de 5.0.

La media del valor de pH final ha sido de 4.64, mientras que del inicial de 5.25. La desviación típica ha sido de 0.1738 y de 0.2605 respectivamente.

B.7. RELACION ENTRE EL CRECIMIENTO DE S. aureus Y LA PRODUCCION DE DESOXIRIBONUCLEASA TERMOESTABLE

Nuestros resultados indican que la relación entre la secreción de DNasa termoestable y el crecimiento de las distintas cepas de estafilococos es casi nula. Esto viene confirmado por el tratamiento estadístico de "coeficiente de regresión" que en el caso de las mayonesas preparadas con aceite de oliva fue de 0.04, y con aceite de girasol de -0.13, indicando ambos valores una gran dispersión de la muestra. La pendiente de la recta fue de 0.132 y de -0.50 respectivamente, siendo la intercepción en el eje de las

←357-

ordenadas de 6.59 y 6.78 en cada caso.

C. DISCUSION

- C.1. INFLUENCIA DEL pH
- C.2. INFLUENCIA DEL INOCULO
- C.3. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA
- C.4. INFLUENCIA DEL TIPO DE ACEITE
- C.5. EVOLUCION DE LA SINTESIS DE ENTEROTOXINAS CON RESPECTO
AL TIEMPO DE INCUBACION
- C.6. EVOLUCION DE LOS VALORES DE pH
- C.7. RELACION ENTRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCION DE
DESOXIRRIBONUCLEASA
- C.8. MAYONESAS COMERCIALES

Es interesante remarcar el hecho de que pese a la presencia de una cantidad apreciable de estafilococos en algunas muestras, y a la detección en ellos de enterotoxina estafilocócica, las características organolépticas de las mayonesas permanecieron invariables a todo lo largo de la experiencia (14 días). Por tanto, externamente no se apreciaba ninguna alteración, a pesar de que la mayonesa puede ser un buen sustrato para la multiplicación de estafilococos y producción de enterotoxinas por los mismos, convirtiendo dicho producto en un alimento cuya ingestión conlleva riesgo para el consumidor.

La acidez de un alimento es un factor importante que determina el crecimiento microbiano. Para tener un efecto inhibitorio los ácidos deben estar en su forma no disociada (BOYLAN et al. 1976). La capacidad conservante de la mayonesa se basa precisamente en el establecimiento de un grado suficiente de acidez como para evitar que se desarrollen los microorganismos. No obstante, la acidez se ve muy neutralizada cuando esta salsa de mesa se utiliza para acompañar algún producto alimenticio, como puedan ser los distintos ingredientes que componen la ensaladilla. MDRITA y WOODBURN (1983) declararon que la adición de los ingredientes de la ensalada incrementó el valor de pH inicial (3.4 a 4.0), con el consiguiente aumento del número de estafilococos en 10 a 100 veces tras ocho horas de incubación a 37°C. A este respecto, nuestros datos señalan que el valor de pH de la mayonesa sufrió un incremento de 0.7 unidades (pH inicial = 5.0) cuando se agregó a un plato preparado a base de ensaladilla congelada comercial. Si se tiene en cuenta que los ingredientes propios de la ensaladilla (patata cocida, huevo cocido, guisantes, etc) son por sí mismos sustratos no inhibitorios para los estafilococos, con el peligro añadido de que las mayonesas con valores de pH de 5.7 permiten el desarrollo de estos microorganismos hasta cifras en las que la cantidad de enterotoxina producida es suficiente para desencadenar el síndrome, se aprecia el peligro potencial que representa el no mantener las debidas precauciones con esta salsa de mesa.

Al comienzo de la experiencia comprobamos que los valores de recuento y la producción de enterotoxinas en mayonesas inoculadas con la cepa 1143 no adicionadas con ningún tipo de diluyente o bien con agua destilada o con jarabe de sacarosa como diluyentes no experimentaban variaciones ostensibles a lo largo de cinco días de incubación a 37°C. En el primer caso, obtuvimos valores de recuento muy dispares, prueba de la difícil dispersión de los microorganismos en la muestra, por lo que consideramos dichos recuentos como no representativos. En aquellas muestras en que utilizamos diluyente, ámbos resultaron en cifras de recuento similares. No obstante, cuando el diluyente fue jarabe de sacarosa la miscibilidad y el manejo fue muy superior que cuando se empleó agua destilada. El aspecto de las muestras fue más homogéneo. La enterotoxina se detectó en las diferentes muestras en las cantidades de 107, 96 y 84 ng EEC/100 g para las no adicionadas de diluyente, con jarabe de sacarosa o con agua, respectivamente. Debido a estas circunstancias las restantes experiencias se realizaron con mayonesa clarificada con jarabe de sacarosa al 52.5% (p/v). En este sentido, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por WOODBURN et al. (1978). Dichos autores señalan que cuando se inocularon estafilococos en medios líquidos a base de una digesta de proteínas, enriquecidos con azúcares reductores los recuentos fueron discretamente superiores a los controles (sin azúcar), pero la producción de enterotoxinas no variaba con los azúcares estudiados. De igual forma, detectaron una

disminución del pH tras 12 y 24 h en las muestras con los distintos azúcares en comparación con las controles. El medio que ellos utilizaron fue preparado a pH 6.8 y en el caso concreto de la glucosa descendió a 5.06. Esto puede en parte justificar los valores bajos de pH registrados por nosotros tras la incubación.

Al igual que ya se discutió en el apartado dedicado al queso manchego, el medio de Baird-Parker ofreció resultados óptimos de recuento, comparables a los obtenidos con medios no selectivos (PCA). El medio de Baird-Parker se recomienda para la recuperación de células tanto sanas como lesionadas por el estrés impuesto por los valores ácidos de pH (GRAY et al., 1974; STILES y CLARK, 1974; NISKANEN y AALTO, 1978; KÖRKEALA y HIRVELA, 1981). El empleo de logaritmos también se justificó en el citado capítulo (Capítulo II, C).

C.1. INFLUENCIA DEL pH

Los resultados obtenidos por nosotros indican que en mayonesas el pH es un factor decisivo. El mecanismo de síntesis de las enterotoxinas es más sensible a los cambios osmóticos que el que controla la multiplicación celular (GENIGEORGIS et al., 1971a). MAGRINI et al. (1983) señalan que la disminución del valor de pH de 6.0 a 5.4 lleva consigo una disminución del ritmo de crecimiento. GENIGEORGIS et al. (1971a) observaron que el pH óptimo para el crecimiento de la

cepa 137 es de 5.0 a 6.5, mientras que para la producción de enterotoxina C1 por dicha cepa es de 5.5 a 6.5. Sin embargo, TROLLER (1976) apunta que el pH óptimo para la síntesis de EEB y de EEC es de 6.8, mientras que para la EEA es de 5.3 a 6.8. GENIGEORGIS y SADLER (1966) indicaron que la producción de enterotoxina B se producía a pH 5.05. A este respecto, REISER y WEISS (1969) estudiaron la producción de las enterotoxinas A, B y C a distintos valores de pH (5.3, 6.0 y 6.8) determinando que, mientras la síntesis de EEA apenas sufre modificación en los distintos pH, las EEB y EEC fueron sensiblemente deprimidas en los más bajos.

Nuestros datos apuntan que el pH es especialmente crítico en el intervalo entre 4.9 y 5.1 (figura RM28). De esta forma, los valores por debajo de 4.9 inhiben de forma manifiesta el desarrollo de los estafilococos, promoviendo su inactivación en pocas horas. Por el contrario, a valores de pH superiores a 5.1 los estafilococos se multiplicaron de forma notable en todas las temperaturas ensayadas, en algunas ocasiones incluso 1000 veces o más en el transcurso de 48-72 horas. De las experiencias realizadas por nosotros podemos concluir que a pH 4.0 no se detectó célula alguna con actividad vital; así mismo, con un valor de pH de 4.9 y con un inóculo de 10^5 , si bien se detectaron células, la media de éstas fue de 1000 a 10.000 por gramo de mayonesa. El valor mínimo de pH en el cual registramos enterotoxina presente en las muestras de mayonesa fue de 5.0, si bien la cantidad fue muy escasa, probablemente a consecuencia de la falta de crecimiento. Así.

los resultados obtenidos discrepan con los de los autores siguientes:

GENIGEORGIS et al. (1971a) señalaron que el pH mínimo para la producción de enterotoxinas era de 4.0 (en caldo con un inóculo de 1×10^8 estafilococos/ml). No obstante, estos autores indican que los resultados derivados de estudios de laboratorio en los que sólo existe un factor limitante para el crecimiento no son extrapolables a los medios con factores de inhibición mixtos como son los alimentos.

TATINI (1973) observó que tanto el crecimiento como la producción de enterotoxina A era factible a pH entre 4.0 y 4.5 en una solución de leche en polvo descremada, coincidiendo con HANSEMAN et al. (1981) quienes sugirieron que para ser eficaz frente al crecimiento la barrera impuesta por el pH éste tenía que ser de 4.5, o una actividad de agua de 0.84, aunque de forma conjunta no se observaba desarrollo de los estafilococos a pH inferior a 4.7 y aw inferior a 0.87.

Por el contrario, coincidimos con varios autores que señalan igualmente que tanto el crecimiento como la síntesis de enterotoxina acaecen en valores de pH no inferiores a 4.9.

BARBER y DEIBEL (1972) indicaron que el pH mínimo para iniciar el crecimiento en aerobiosis era de 5.1, mientras en anaerobiosis era de 5.7, aunque MINOR Y MARTH (1972) y posteriormente TROLLER (1976) informaran que el pH mínimo que permite el crecimiento es de 4.6 a 4.7, dependiendo del ácido empleado para ajustar el pH.

GENIGEORGIS y SADLER (1966) y MORSE et al. (1969) demostraron que la enterotoxina B se sintetizaba a pH 5.0, mientras que el pH mínimo para la de enterotoxina A es de 4.9. SCHEUSNER y HARMON (1973) y TROLLER (1976) informaron que las enterotoxinas no se producían a valores de pH inferiores a 5.0, coincidiendo con RIEMANN et al. (1972) quienes sólo detectaron enterotoxina B en carne en valores de pH iguales o superiores a 5.0.

Ya señalamos en el capítulo correspondiente (Capítulo II, apartado C.) que HEIDELBAUER y MIDDAGH (1973) opinaban que en queso en pasta no se produce enterotoxina a pH < a 5.5.

La discrepancia entre los valores obtenidos por nosotros con respecto a aquellos autores que demostraron la presencia tanto de estafilococos con actividad vital como de enterotoxinas en medios con un grado superior de acidez puede obedecer a que en la mayonesa no sólo se puede estimar que el

ácido láctico sea la única causa represiva sino que existen otros factores que llevan consigo un menor crecimiento. Ya señalaron GENIGEORGIS et al. (1971a) la existencia de interdependencias o "hurdles" entre los factores inhibitorios. Dentro de los mismos hay que considerar:

La actividad de agua que, aunque nosotros no hemos comprobado cuál era el valor de nuestras muestras, DOYLE et al. (1982) evalúan la misma que en mayonesa en 0.925.

También es interesante señalar lo apuntado por VADEHRA y HARMON (1965) en el sentido que la actividad lipolítica de los estafilococos puede limitar su crecimiento en crema. MINOR y MARTH (1972) coincidieron con los autores anteriores indicando que el grado de crecimiento en crema puede restringirse por la actividad metabólica del estafilococo, refiriéndose en concreto a la actividad lipolítica. El fenómeno de la lipólisis implica la aparición de ácidos grasos que en su mayor parte son tóxicos para los microorganismos. A este respecto, nuestros resultados apuntan hacia la existencia de una clara dependencia del tipo de aceite, como se observa en la tabla RM2. En valores de pH inferiores o iguales a 5.0 y en todas las temperaturas, las mayores cifras de recuento se registraron en las mayonesas preparadas con aceite de girasol, lo que indicaría que el pH y la acidez

del aceite (el aceite de girasol empleado por nosotros tuvo siempre una acidez máxima de 0.2 grados mientras que la del de oliva fue de 0.4 a 0.8 grados) ejercen un efecto sumatorio, inhibiendo el desarrollo. Pero también podría obedecer a una degradación más exacerbada de los ácidos grasos del aceite de oliva, resultando en productos más tóxicos para los estafilococos. En valores de pH superiores, sin embargo, las cifras máximas de recuento se han registrado en las mayonesas preparadas con aceite de oliva.

Otro factor que podría ser tenido en consideración es la presencia de lisozima proveniente del huevo utilizado como materia prima, aunque PAUL y POTTER (1978) manifestaran que la concentración en este alimento es mínima.

El hecho de que el crecimiento sea superior en las mayonesas preparadas con aceite de oliva que de girasol puede también expresarse en términos de disponibilidad de nutrientes, por lo que en el rango de pH superior a 5.1 podrían ser más utilizables los ácidos oleicos que los linoleicos. Este es un supuesto que no hemos comprobado.

Conforme GENIGEORGIS et al. (1971c) y BARBER y DEIBEL (1972) y LOTTER y LEISTNER (1978) el número mínimo de estafilococos

capaces de elaborar toxinas en cantidades suficientes para provocar los síntomas es de $1-4 \times 10^7$ /g, pero SCHEUSNER et al. (1973) opinan que sólo es posible con un número más elevado (5.5×10^8) de células/ml. Por otra parte, GENIGEORGIS et al. (1971a) señalaron una cifra de recuento inferior para la síntesis de EEA ($3-5 \times 10^6$ células/ml de caldo), aunque en carne la cifra mínima fuera de 4×10^7 (GENIGEORGIS et al., 1971c), concluyendo que las ecuaciones teóricas obtenidas en condiciones laborales, no eran extrapolables a los alimentos. Nuestros datos señalan que la concentración mínima de estafilococos que sintetizaron enterotoxina en cantidades mensurables correspondió a 8×10^4 , valor de recuento de la cepa 1173 inoculada en mayonesas preparadas con aceite de girasol e incubadas a 22 y a 28°C (6.45 y 16.8 ng/100 g, respectivamente). Al igual que lo expresado en el capítulo II (apartado C.7.3.) esto pudiera tener su origen en la utilización por nosotros de un método de detección de enterotoxinas con mayor sensibilidad que los utilizados por otros autores, así como por haber procedido a concentrar nuestras muestras, detectando de esta forma cantidades trazas de enterotoxinas.

C.2. INFLUENCIA DEL INOCULO

GENIGEORGIS et al. (1971c) indicaron que son necesarias menos células para iniciar el crecimiento en alimentos que en caldo nutritivo a igualdad de concentración de ClNa y de pH. La

cantidad de estafilococos en el inóculo, según HAINES y HARMON (1973a), afecta tanto al crecimiento como a la síntesis de enterotoxinas. Nosotros no hemos hallado diferencias entre los distintos inóculos estudiados, adquiriendo proporciones similares el recuento tras tres días de incubación. Coincidimos con GENIGEORGIS et al. (1971a) en este sentido, ya que ellos observaron que la EEA se produce con $3-5 \times 10^6$ células/ml independientemente del inóculo, aunque al incrementar las condiciones limitantes, se exija más inóculo para comenzar el crecimiento (GENIGEORGIS et al., 1971b). Así mismo, MINOR Y MARTH (1972) y FUNG (1972) expresaron que el crecimiento y la cantidad de enterotoxina producida eran similares con inóculos de 10^3 y 10^7 células por mililitro.

C.3. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Hemos observado un mayor crecimiento en las temperaturas más bajas de incubación (22 y 28°C) que en las más altas (37 y 44°C). Estos resultados discrepan con las observaciones anteriores realizadas en otros medios y, por tanto, creemos se deba a las características intrínsecas de la mayonesa. Las emulsiones son más estables a temperaturas más bajas, rompiéndose la cohesión intermolecular en las más elevadas. Así, a 44°C el tamaño de los glóbulos grasos es superior que a 22°C, siendo a esta última temperatura los ácidos grasos más atacables por los microorganismos. SCHEUSNER et al.

(1970) indicaron que existían diferencias entre las cepas de estafilococos en cuanto a los valores máximos de temperatura que permite el crecimiento y la síntesis de enterotoxinas. El rango de temperaturas comprendido entre 19 y 39° C fue considerado por estos autores como totalmente permisivo en cuanto a crecimiento se refiere, a pesar de que ANGELOTTI et al. (1961) apuntaron que el crecimiento es posible en el intervalo de temperaturas de 6.7 a 45.5. Nuestros datos expresan que en mayonesas, el crecimiento a 44° C es totalmente factible, adquiriendo en algunos casos las mismas características que a 37° C.

Con posterioridad a que IANDOLO et al. (1964) señalaran que la temperatura óptima de crecimiento de los estafilococos se establece en 37° C se han realizado múltiples estudios. De acuerdo con MARLAND (1967) la EEB se produce entre 15.2 y 43.2° C. Nuestros datos señalan que es posible la síntesis en mayonesa de todas las enterotoxinas en el rango de temperaturas de 22 a 44° C. No obstante, al igual que dejaron patente IBRAHIM y BALDOCK (1981) hay diferencias entre las cepas en cuanto a crecimiento y secreción de enterotoxinas en cada temperatura.

A valores de pH inferiores a 5.0 sólo hay crecimiento a 37° C. Según lo expresado en la tabla de porcentaje de producción en cada temperatura con respecto al máximo (RM7) la cantidad más elevada de enterotoxina se secretó a 38° C (31.05%), y la inferior (22.7%) a 22° C. En nuestra opinión, esto sería

explicable porque si bien el crecimiento fue óptimo a 22°C, sin embargo puede que esta temperatura sea relativamente inadecuada para la síntesis de enterotoxinas, ya que hay que tener en cuenta los factores de acidez y de actividad de agua, principalmente. Incluso a 22°C no se pudo detectar enterotoxina en mayonesas inoculadas con cepas que si que lo habían permitido en otras temperaturas.

C.4. INFLUENCIA DEL ACEITE

Es curioso el hecho que con la cepa 913 no se detectara enterotoxina presente en las mayonesas preparadas con aceite de oliva incubado a 28°C, pero que cuando el aceite fue de girasol, las cantidades fueran muy elevadas. Esta fue la única cepa en la que se experimentó dicho fenómeno que podría ser debido a una alteración en el metabolismo de la citada estirpe.

Aparentemente, se ha secretado más enterotoxina en mayonesas preparadas con aceite de girasol (33.1 ng/100 g) que en las de oliva (22.5 ng/100 g). Al igual que antes, también puede reflejar que los productos del metabolismo estafilocócico de los ácidos grasos no reprimen la síntesis cuando proceden del ácido linoleico y sí cuando lo hacen del oleico.

C.5. EVOLUCION DE LA SINTESIS DE ENTEROTOXINA CON RESPECTO AL

TIEMPO

La evolución de la cantidad de enterotoxina registrada a lo largo de un periodo de tiempo indica que tras alcanzar un máximo de enterotoxina producida, la cantidad experimentaba una regresión, bien gradual o bien drástica. A nuestro entender esto se puede justificar de varias formas:

a) Se ha indicado anteriormente (WARREN et al., 1975; HUMBER et al., 1975; JAMLANG et al., 1971; WARREN et al., 1974) que existe una dependencia entre el pH y la estabilidad de las moléculas de enterotoxina, de forma que a valores inferiores de pH es más susceptible de ser inactivada. Esto podría suponer cambios conformacionales de la molécula, por lo que la reacción antígeno-anticuerpo, en la que nos basamos para la técnica de detección ELISA, sufriría alteraciones. La disminución en la cantidad detectada, no obstante, no debería entenderse en el sentido de una disminución de la toxicidad de la molécula, puesto que la actividad biológica y la inmunológica pueden no radicar en los mismos determinantes o zonas de la molécula.

b) Conjugación de las enterotoxinas con algún factor presente en el alimento, quedando los determinantes antigénicos encubiertos por el mismo, impidiendo su

reacción con el antígeno. Este englobamiento podría requerir cierto tiempo para producirse, por lo que las enterotoxinas se detectarían en un principio. Igualmente, su carácter de reversibilidad podría justificar la aparición de curvas bifásicas registradas en las muestras 350 (D), 472 (D) pH 5.8 y 1183 (G), en las que tras una disminución temporal de la cantidad de enterotoxina presente, la concentración de ésta retornó a incrementar.

Hemos de hacer notar que un fenómeno similar se registró en los quesos de tipo manchego (Capítulo II) en cuanto a la cantidad de desoxirribonucleasa (valorada por el método de agar de azul de toluidina) y a la enterotoxina presente, produciéndose curvas cíclicas de detección de ambas proteínas a lo largo del tiempo de maduración o afinado de los mismos.

C.6. EVOLUCION DE LOS VALORES DE pH

En la mayoría de los casos se experimentó un descenso acusado del valor de pH inicial (disminución media de 0.7 unidades de pH). MORITA y WOODBURN (1983) observaron un mismo fenómeno en salsas condimentadas, indicando que, de forma general, cuando el pH era elevado (>5.8) disminuía en 8 h y continuaba descendiendo a lo largo del experimento. Cuando el pH inicial era bajo ($5-5.6$) incrementó en 8 h y, bien permaneció así o bien mostró un ligero descenso en 24 h. En nuestras manos, se

observó un incremento del pH principalmente cuando éste fue inicialmente de 4.0 a 5.0; en las restantes muestras se observó una disminución del valor inicial del pH. En el apartado correspondiente a la discusión de los resultados habidos con el queso manchego se indicó que se observaba un aumento del valor de pH a medida que los microorganismos morían al final de la fase de maduración. La liberación de sustancias aminadas puede ser responsable, tanto en el queso (Capítulo II, apartado C.7.2.) como en las mayonesas, del alza del valor de pH, ya que en éstas también coincide con aquellos valores del pH donde no hay crecimiento sino destrucción celular. De igual forma, tras once días de incubación se experimentó un ligero incremento en el pH, que también podría ser debido a la destrucción celular o a un metabolismo menos activo.

C.7. RELACION ENTRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCION DE DESOXIRIBONUCLEASA

No hemos detectado una correlación inequívoca entre los valores de recuento y la actividad DNasa. Esta discrepancia con múltiples autores ya fue discutida en el apartado dedicado a la discusión de los resultados del queso manchego. La falta de correlación entre el crecimiento y la producción de desoxirribonucleasa (coeficiente de regresión de 0.04 y -0.16 para las mayonesas preparadas con aceite de oliva y de girasol, respectivamente) radica en el hecho de que existe

una multitud de muestras en las que el valor de la actividad enzimática no corresponde con el crecimiento. Este fenómeno presenta dos vertientes: por un lado aquellas muestras en las que apenas se registró actividad celular y sin embargo se detectaba actividad DNAsa; por otro, las muestras que aun presentando un desarrollo notable apenas se detectó actividad DNAsa.

El primer grupo está muy condicionado por el valor de pH inicial de la mayonesa, de forma que el 100% de las mayonesas con pH inicial de 4.0 cuya media del logaritmo de UFC/g era inferior a 5.0 presentaban un halo de actividad DNAsa superior o igual a 9 mm. Las cifras respectivas para otros valores de pH son: el 25% de pH 4.5, el 50% de las de pH 4.8, el 100% de las de pH 4.9 y el 94.7% de las de pH 5.0. A valores de pH superiores a 5.0 no se observó ningún caso en el que con un nivel bajo de crecimiento se registrara una actividad DNAsa elevada. Este fenómeno se observó a todas las temperaturas experimentales. Así, el 97.5% de las muestras incubadas a 22°C, el 60% a 28°C, el 72% a 37°C y el 85.7% a 44°C cuyo crecimiento había sido en términos globales inferior a 100.000 UFC/g se detectaron valores elevados de actividad DNAsa.

En el segundo grupo se englobaron 16.7% de las mayonesas preparadas con aceite de girasol y el 15.49% de las

preparadas con aceite de oliva. Las cepas que presentaron este fenómeno en alguna de las muestras fueron: 100 (12.5%), 137 (12%), 350 (6.7%), 379 (18.2%, todas preparadas con aceite de girasol), 913 (86.7%) y S6 (7.4%). Se produjo el fenómeno de forma esporádica en todos los valores de pH iniciales de la mayonesa superiores o iguales a 5.1 y sin guardar relación alguna con la temperatura o los días de incubación. La cepa 913, aun adquiriendo cifras de recuento elevadas (30×10^6 UFC/g) mostró una actividad DNAsa negativa en 86.7% de las mayonesas inoculadas con la misma.

C.8. MAYONESAS COMERCIALES

DOYLE et al. (1982) analizaron ciertas salsas expendidas en los establecimientos de Estados Unidos, tanto con una base oleosa como acuosa. Indicaron que el pH de las mismas era de 3.6 a 4.0. Nuestro esquema de experimentos incluía estudiar el comportamiento de los estafilococos en mayonesas comerciales. Al igual que lo expresado anteriormente, se procedió a estudiar la mayonesa entera y diluida con jarabe de sacarosa (62.5%) y con agua, no observando crecimiento en ninguno de los casos. No procedimos a corregir el pH de estas mayonesas comerciales.

La incapacidad para soportar crecimiento mostrada por las

mayonesas comerciales estudiadas por nosotros puede obedecer a un pH inicial extremadamente bajo (4.0). No obstante, no podemos comparar nuestros resultados con los de los autores anteriores, puesto que ellos estudiaron el crecimiento habido por la adición de las salsas a ensaladas compuestas por carne, concluyendo que retardaban el desarrollo de los estafilococos, por una disminución del valor de pH.

CAPITULO IV:

LECHE CONDENSADA

A. INTRODUCCION

- A.1. LECHE CONDENSADA
- A.2. EFECTO DE LA a_w EN MEDIOS LABORATORIALES
- A.3. EFECTO DE LA a_w SOBRE LA SINTESIS DE ENTEROTOXINAS
- A.4. EFECTO DE LA a_w SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESTAFILOCOCOS Y
LA SINTESIS DE ENTEROTOXINAS EN LOS ALIMENTOS
- A.5. EFECTO DEL HUMECTANTE EMPLEADO
- A.6. RESISTENCIA A LA INACTIVACION

A.1. LECHE CONDENSADA

El Código Alimentario Español define la leche condensada como aquella leche higienizada "concentrada con azúcar" privada de parte de su agua de constitución y cuya conservación se consigue mediante la adición de sacarosa.

Las características que vienen enumeradas en dicho Código son las siguientes:

Materia grasa, como mínimo, 8 por 100 en peso.

Extracto seco magro (sin azúcar), como mínimo 22 por 100 en peso.

Impurezas macroscópicas, grado 0

La proporcionalidad del azúcar variará de un mínimo a

un máximo, fijado por las siguientes fórmulas :

Mínimo por ciento igual a sesenta y dos coma cinco menos cero coma seiscientos veinticinco multiplicado por E ($62.5 - 0.625 \times E$).

Máximo por ciento igual a sesenta y cuatro coma menos cero seiscientos cuarenta y cinco multiplicado por E ($64.5 - 0.645 \times E$).

Siendo el factor E igual al tanto por ciento de extracto seco total sin azúcar.

Menos de 30.000 colonias de gérmenes por gramo.

Ausencia de coliformes en 0.1 gramos

Prueba de la fosfatasa negativa.

La leche condensada es un producto de gran consumo en nuestro país. Ha representado una forma de tratar el excedente de leche y de transportarlo y almacenarlo comodamente, permitiendo así el consumo en lugares de la geografía deficitarios en ganado lechero. Sus características conservantes se basan en la alta proporción de azúcar que contienen, por lo que sólo los microorganismos osmotolerantes pueden crecer y desarrollarse en este derivado lácteo.

Los estafilococos son particularmente tolerantes a los niveles bajos de humedad, una característica que se explota con frecuencia por la adición de concentraciones relativamente elevadas de ClNa a los medios selectivos y en la conservación de los alimentos secos y salados, en mermeladas y en aquellos productos que lleven gelatina en su

composición. Si se tiene en cuenta que en los locales donde se almacenan los botes de leche condensada pueden experimentar temperaturas elevadas en verano, se comprenderá la importancia de la presencia de estafilococos en este derivado lácteo, ya que pudieran desarrollarse y producir enterotoxinas, convirtiendo este producto en potencialmente tóxico.

SCOTT (1953) investigó el efecto de la actividad de agua (a_w) sobre el crecimiento de 14 cepas enterotoxigénicas, hallando que los ritmos de crecimiento se reducían de forma uniforme a medida que la a_w decrecía por la adición de solutos. Incluso apuntó que la a_w mínima que permite el crecimiento estafilocócico (0.86) era independiente del medio y de los solutos empleados para ajustar la a_w del medio así como que del contenido mínimo de agua que permitiría el crecimiento. SCOTT concluyó que la cantidad mínima de agua necesaria para el crecimiento bacteriano se expresaba más convenientemente en términos de actividad de agua en vez de contenido relativo de agua o concentración de los solutos. De esta forma, los cambios mínimos en las concentraciones críticas de los solutos impedirían o limitarían la producción de enterotoxinas.

La adición de solutos al sistema deprime la a_w de acuerdo con su cantidad y la naturaleza. LÜTTER y LEISTNER (1978) indican que 1% de materiales tales como cloruro sódico, glucosa y proteína de la leche pueden deprimir la a_w del agua pura en

0.01. Los alimentos con la misma cantidad de agua no tienen necesariamente la misma a_w y viceversa. La actividad de agua de los alimentos influye sobre la fase de latencia, el ritmo de crecimiento y los tipos de los microorganismos que puedan desarrollarse.

La actividad de agua (a_w) se define como la relación entre la presión de vapor de una solución (P) y la del agua pura (P_0) a la misma temperatura o la centésima parte de la humedad relativa de la atmósfera una vez en equilibrio con el material a estudiar (TROLLER, 1971; TROLLER y STINSON, 1975; GENIGEORGIS, 1981).

GENIGEORGIS (1981) estima que la a_w mínima para el crecimiento se afecta por un número de factores como son la disponibilidad de nutrientes, el potencial redox (Eh), la temperatura, el pH, el tipo de humectante utilizado para controlar la a_w , el método de control, y la concentración inicial de la cepa.

A.2. EFECTO DE LA a_w EN MEDIOS LABORATORIALES

El grado de humedad necesario para el desarrollo de *Staphylococcus aureus* en términos de a_w ha sido estudiado extensivamente a partir de 1953, año en que se define este parámetro. En general, el efecto de la disminución de la a_w es más marcado sobre la producción de enterotoxinas que sobre el crecimiento

(GENIGEORGIS y SADLER, 1966; McLEAN et al., 1968; HOJVAT y JACKSON, 1969; TROLLER, 1971; TROLLER, 1972).

En condiciones de aerobiosis se requieren valores de 0.86 a 0.88 (SCOTT, 1953; CHRISTIAN y WALTHO, 1962; MARSHALL et al., 1971) para que el crecimiento estafilocócico sea efectivo, sin que la naturaleza de los solutos presentes tenga un efecto apreciable, aunque investigaciones posteriores han indicado que es posible a a_w de 0.94 (HANSEMAN et al., 1981; LEE et al., 1981). En anaerobiosis el valor a_w mínimo es de 0.90 (SCOTT, 1953).

En caldo de infusión de cerebro corazón con la actividad de agua controlada por ClNa, TROLLER (1972) observó que el periodo de generación de *Staphylococcus aureus* 196E, que sintetiza EEA, de 30 minutos, se incrementó a 1000 minutos al incubar a 37 °C cuando la a_w se redujo de 0.98 a 0.885, y de 37 a 150 minutos al disminuir la a_w de 0.98 a 0.89.

A.3. EFECTO DE LA a_w SOBRE LA SINTESIS DE ENTEROTOXINAS

La síntesis de enterotoxina A se inhibe de forma marcada por la disminución de a_w , aunque su producción sea relativamente menos sensible a la a_w que lo es la EEB (TROLLER, 1971, 1972). Mientras que la cantidad máxima de enterotoxina A medida fue directamente proporcional a la a_w , sintetizándose en valores cercanos a los de crecimiento (TROLLER, 1971;

LOTTER y LEISTNER, 1978), la respuesta inhibitoria fue considerablemente inferior a la de la enterotoxina B. La reducción de la a_w de 0.99 a 0.945 determinó una caída del 60% de la concentración de enterotoxina A. Sin embargo, la reducción de 0.99 a 0.97 ó 0.98, aun permitiendo el crecimiento óptimo de la cepa C243 (10^9 células/ml) disminuyó los niveles de EEB en 90 a 99%, dependiendo del soluto empleado para ajustar la a_w .

La a_w mínima calculada por TROLLER (1972) para la producción de enterotoxina estafilocócica A en medios de cultivo laboratoriales fue de 0.90, pero posteriormente LOTTER y LEISTNER (1978) analizaron la actividad de agua mínima para la síntesis de EEA y para el crecimiento de Staphylococcus aureus. Manifestaron que en condiciones óptimas, es decir, en un medio rico en nutrientes y vitaminas, con una actividad de agua controlada por una mezcla de sales e incubada a 30°C, el crecimiento y la formación de enterotoxina A se inhibía entre 0.864 y 0.867, pero a 25°C, los valores correspondientes ascendieron a 0.870 y 0.867, habiendo de proseguir la incubación durante dos semanas para apreciar la presencia de enterotoxina. A raíz de sus trabajos recomendaron que los 'alimentos de humedad intermedia' (IMF - Intermediate Moisture Food) no debían tener una actividad de agua superior a 0.86, debiéndose inhibir todo crecimiento estafilocócico que implicara el riesgo de producción de enterotoxinas.

LOTTER y LEISTNER (1978) estimaron igualmente que existe una

discrepancia llamativa entre la aw calculada y la medida (la primera suele ser 0.02 unidades superior a la segunda). Este fenómeno se explicaría porque la actividad de agua se calcula en función de unos datos teóricos de sales solubles en agua pura, mientras que la aw medida se ve afectada por los hidrolizados de proteína, azúcares y sales solubles presentes en el medio, que pueden deprimir la actividad de agua. Indicaron como ejemplo que 1% de dichos materiales, tales como cloruro sódico, glucosa o proteína de la leche pueden disminuir la aw aproximadamente 0.01 cuando se encuentran disueltos en agua pura.

La enterotoxina C sigue un modelo semejante al de la EEB, pero GENIGEORGIS (1981) no considera oportuno extrapolar estos datos al resto de los tipos de enterotoxina (D, E y F), puesto que el comportamiento parece variable. Antes bien, resultaría aconsejable una cuidadosa experimentación con cada tipo, en vista de las divergencias comprobadas con los modelos de los tipos A y B de enterotoxina.

A.4. EFECTO DE LA aw SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESTAFILOCOCCOS Y LA SINTESIS DE ENTEROTOXINA EN ALIMENTOS

Se han preparado varios alimentos con humedad intermedia (IMF) con una actividad de agua en el rango de 0.90 a 0.60, tales como cerdo agridulce, pollo y hennican. La actividad de agua de algunos de estos alimentos de humedad intermedia se

ajusta a 0.85 a 0.90 a fin de evitar la pérdida de sabores por el uso excesivo de humectantes. Incluso las leyes de diversos países prohíben la adición de humectantes tales como el glicerol y el propilén glicol. De acuerdo con FAUSEY y DAVIES (1976) es posible el crecimiento lento o la supervivencia prolongada de Staphylococcus aureus en IMF. Las enterotoxinas A, B y C también pueden producirse por células no replicantes que pueden servir como fuente de contaminación en alimentos de humedad intermedia (JARVIS et al., 1975; FAUSEY y DAVIES, 1976).

Los resultados habidos en los medios laboratoriales no son extrapolables a los alimentos. A esta conclusión llegaron TROLLER y STINSON (1975) quienes indicaron que las cepas 196E y C243 crecieron bien en pasta de camarones cuya aw se había ajustado a 0.91. No obstante, las limitaciones de agua habían reprimido los recuentos máximos y los ritmos de crecimiento de ambas cepas. La actividad de agua de 0.89 impidió el crecimiento de la cepa 196E aunque se apreciara un ligero incremento de los recuentos de la cepa C243 durante las 24 h iniciales de incubación de las pastas.

TROLLER y STINSON (1975) determinaron la aw mínima en diversos preparados alimenticios para la producción de EEA y EEB a 37°C: pasta de camarones. EEA = 0.95, EEB = 0.93; pasta de patata, EEA = 0.93, EEB = 0.97. TATINI (1973) había notificado anteriormente que la síntesis de enterotoxinas se podía producir en alimentos a aw más bajas.

La influencia de la relación humedad/sal sobre la actividad de agua fue estudiada por FOWERS et al. (1981) en bacon enlatado. Concluyeron que no es posible tomar el primer parámetro como medida del segundo ya que es posible que el bacon tenga una relación de humedad/sal inferior o igual a 9.0 y todavía mantener una actividad de agua de 0.86. Igualmente, LEE et al. (1981) informaron que el bacon inoculado con la cepa 100 se sintetizaba enterotoxina A siempre que se produjera crecimiento, y éste se daba ya a una actividad de agua de 0.84 en condiciones de aerobiosis y a 0.88 en anaerobiosis.

A.5. EFECTO DEL HUMECTANTE EMPLEADO

El efecto de la a_w en el grado de enterotoxina sintetizada puede estar influido por el tipo de humectante empleado para controlar la actividad de agua. TROLLER (1976) manifestó que en medios con solutos mixtos, compuestos por ClNa, ClK y SO_4Na_2 (relación molar 5:3:2) se puede formar el doble de enterotoxina B, que con un único soluto (ClNa).

TROLLER y STINSON (1975) utilizaron glicerol como humectante e informaron que la cepa 196E secretaba enterotoxina A hasta una a_w de 0.95, mientras que la C243 producía enterotoxina B a a_w de 0.93, en desacuerdo con los resultados anteriormente expresados por TROLLER (1971, 1972) con medios de

laboratorio. La diferencia entre ambos estudios la justificaron LOTTER y LEISTNER (1978) por el hecho de que el glicerol fue el humectante empleado en los estudios con alimentos mientras que los realizados con medios de cultivo, se utilizaron sales. En este sentido MARSHALL et al. (1971) manifestaron que en los niveles de a_w entre 0.96 y 0.90, el glicerol puede inhibir el crecimiento de *S. aureus* en más del 10% que lo hace el ClNa. Sin embargo, TROLLER y STINSON (1975) indicaron que el glicerol posee propiedades inhibitorias intrínsecas mínimas, en comparación con otros solutos añadidos.

A.6. RESISTENCIA A LA INACTIVACION

Un problema añadido al crecimiento de *S. aureus* en alimentos de humedad intermedia es el hecho de que la actividad de agua baja incrementa la resistencia a la inactivación por el calor. GOEPFERT et al. (1970) hallaron que la resistencia térmica de las salmonelas incrementaba a medida que disminuía la a_w del medio de calentamiento. HSIEN et al. (1975) mostraron que la resistencia térmica aumentaba en el rango de a_w de 0.70 a 0.80 en soluciones de infusión de cerebro y corazón con glicerol. La máxima resistencia a la inactivación térmica tiene lugar en valores de a_w entre 0.75 y 0.80 (HSIEN et al., 1976), incrementando 4 y 10 veces, respectivamente. Concluyeron que para garantizar la seguridad de los alimentos, los componentes de los IMF deberían ser

esterilizados antes de ser mezclados con las sustancias que rebajan la aw.

La capacidad de crecimiento en aw baja depende de la cepa. HILL (1975) y TROLLER (1976) observaron que la aw mínima era de 0.83, el primero en un medio con infusión de cerebro, el segundo en un medio de hidrolizado de proteína, ajustando la aw con ClNa. Pero esta resistencia depende en gran medida de la cepa a estudiar. TROLLER (1976) sólo encontraron una cepa de siete, capaz de crecer a 0.83.

Los resultados de NOTERMANS y HEUVELMAN (1983) indican que la aw mínima para el crecimiento de *Staphylococcus* fue de 0.67 (igual que SCOTT y TROLLER, 1971). La producción de EEA, EED y EEF es claramente más sensible al efecto de la aw que lo es la síntesis de EEA. En cultivos en lotes, no se sintetizó ninguna de las toxinas anteriores en aw < 0.93, pero sí que se detectó EEA. Incluso a aw de 0.90 se pudo detectar cantidades considerables de EEA. Así mismo, indicaron que la síntesis de EEA se producía en todas las condiciones de aw que permiten el crecimiento, mientras que la de EED se afecta principalmente por la aw, y la de EED y EEF depende del efecto combinado de la aw y de la temperatura.

B. RESULTADOS

B.1. EVOLUCION DEL DESARROLLO DE LAS DISTINTAS CEPAS

B.2. INFLUENCIA DE LA MARCA

B.3. INFLUENCIA DEL INOCULO

B.4. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION

Al igual que se mencionó en los dos alimentos anteriores (queso de tipo manchego y mayonesa), las cualidades organolépticas del producto no sufrieron variación con respecto a las iniciales, tanto aquéllas en las que la muestra fue diluida con jarabe de sacarosa (62.5%) como en las que no se recurrió a esta operación. Así mismo, al igual que lo expresado anteriormente, los valores de recuento fueron muy similares en los dos medios utilizados, aunque hay que hacer mención que, a diferencia de los otros dos alimentos, en el estudio de la leche condensada se utilizaron medio de Baird-Parker (BP) y agar sangre (AS).

B.1. EVOLUCION DEL DESARROLLO DE LAS DISTINTAS CEPAS

En las figuras RL1 a RL8 y en las tablas RL1 y RL2 se muestra la evolución de los recuentos de UFC de estafilococos/g durante 14 días de incubación. En dichas figuras se aprecia cómo la fase logarítmica se prolonga hasta el cuarto día en las cepas 137, 325 y 472, en las que esto fue muy acusado. En

Figura RL 1: Representación gráfica del desarrollo de *S. aureus* cepa S 6 en leche condensada en un periodo de 14 días de incubación.

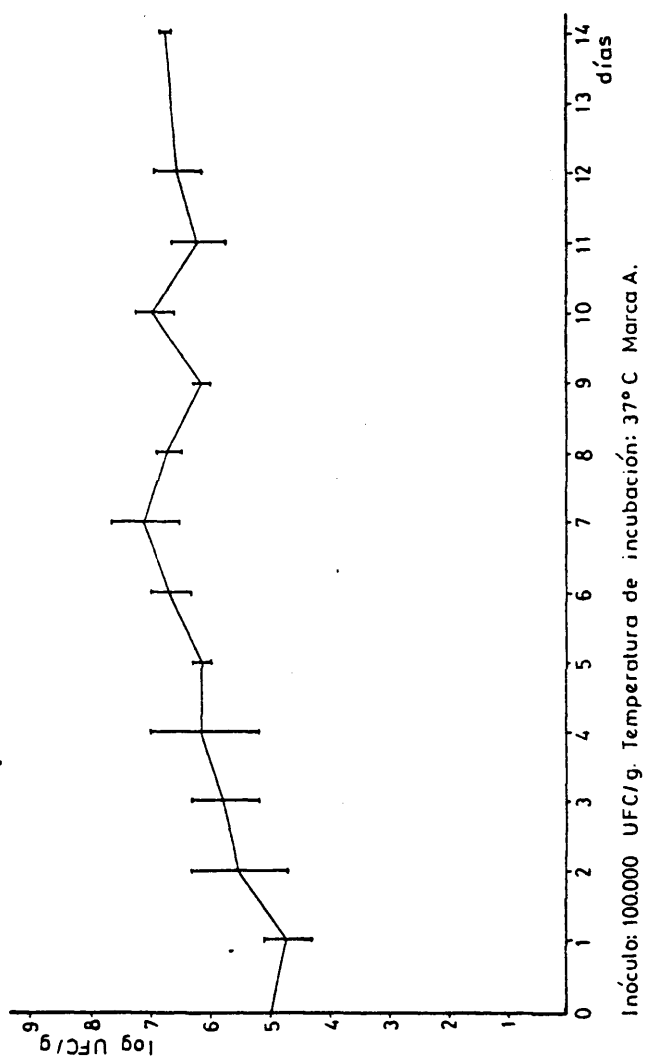


Figura RL 2: Representación gráfica del desarrollo de S.aureus cepa 100 en leche condensada en un período de 14 días de incubación.

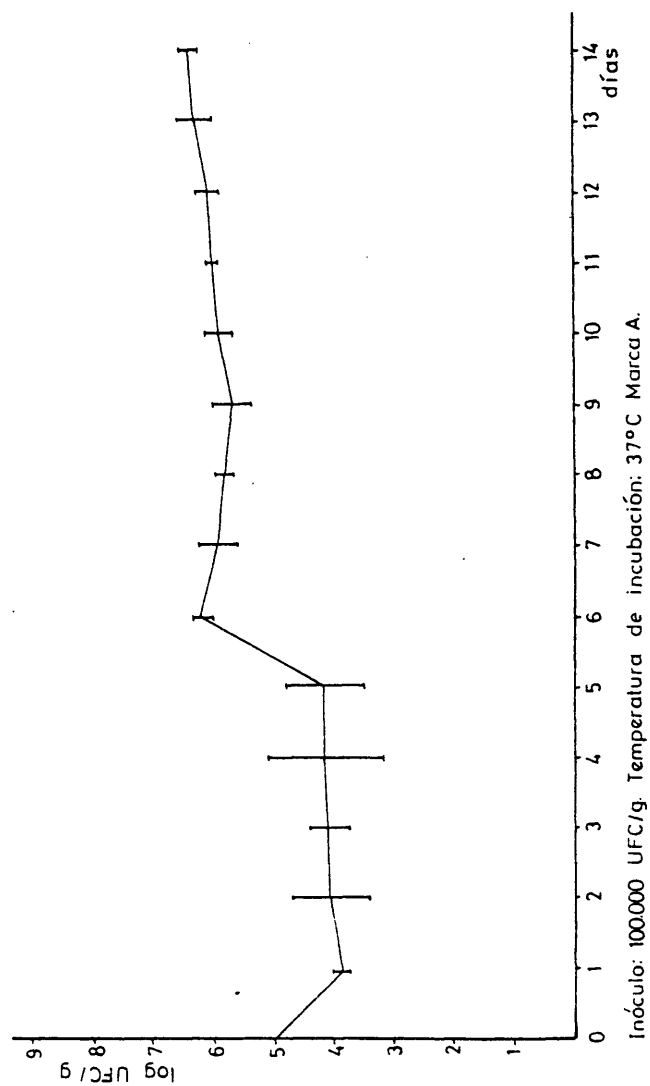


Figura RL3: Representación gráfica del desarrollo de S. aureus cepa 137 en leche condensada en un periodo de 14 días de incubación.

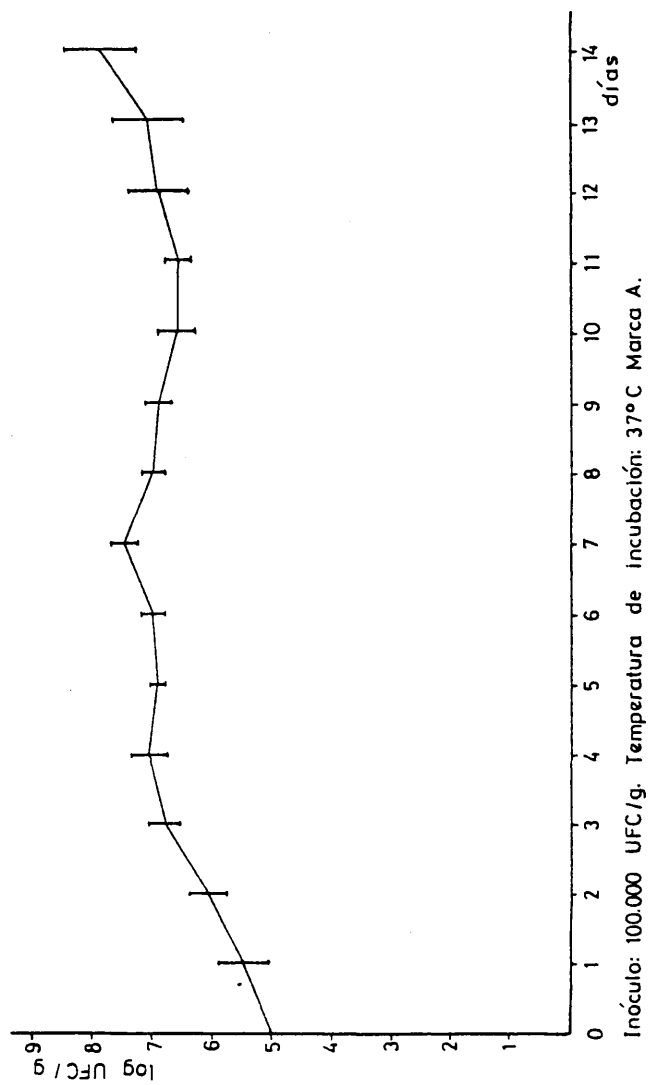


Figura RL 4: Representación gráfica del desarrollo de *S. aureus* cepa 161 en leche condensada en un período de 14 días de incubación.

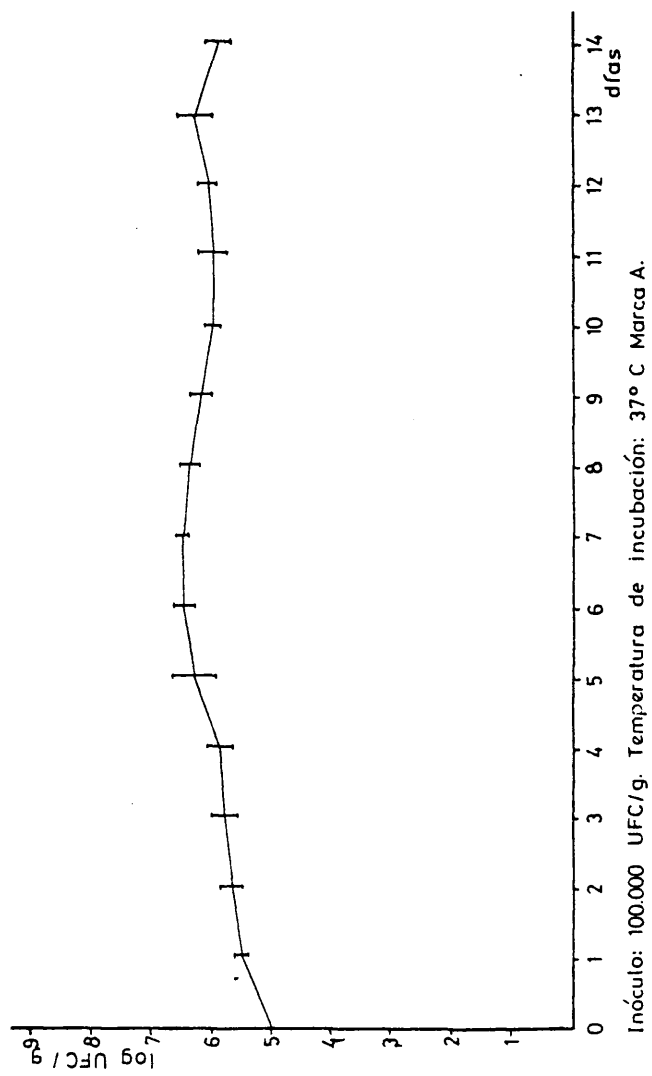


Figura RL5: Representación gráfica de la influencia del inóculo sobre el desarrollo de *S. aureus* cepa 196 E en leche condensada en un periodo de 14 días de incubación.

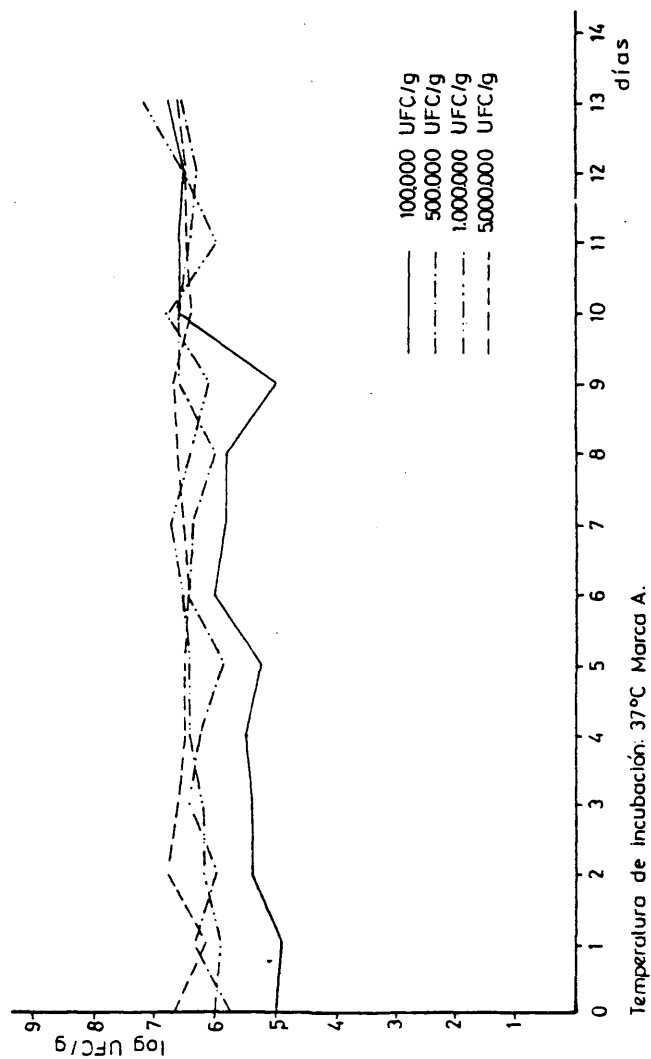


Figura RL 6: Representación gráfica del desarrollo de *S. aureus* cepa 326 en leche condensada en un periodo de 14 días de incubación.

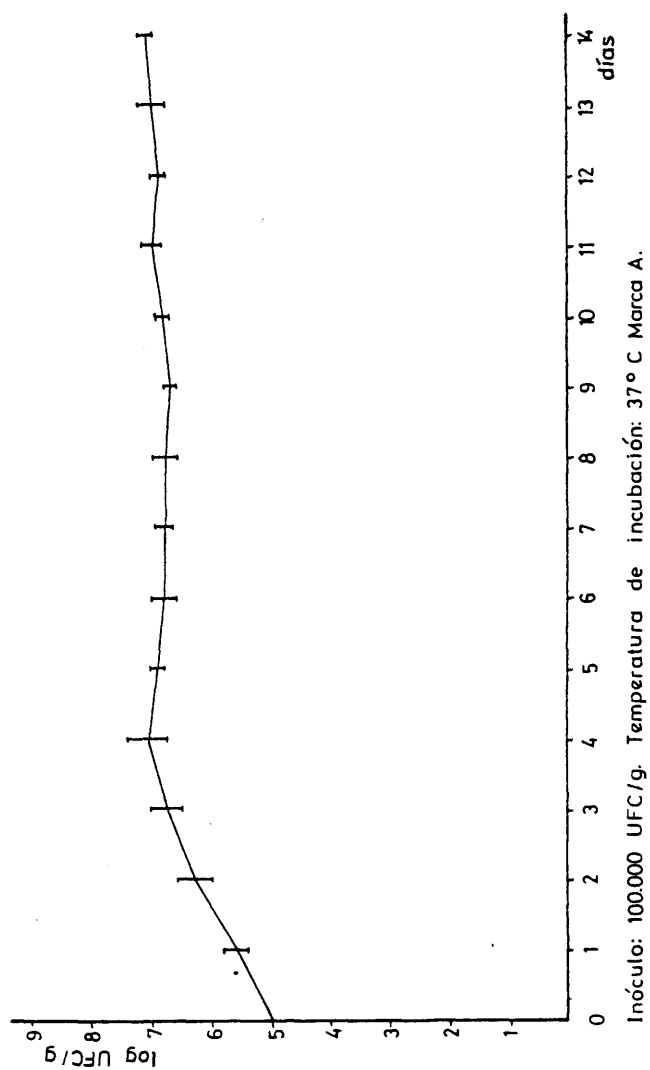


Figura RL 7: Representación gráfica del desarrollo de *S. aureus* cepa 379 en leche condensada en un período de 14 días de incubación.

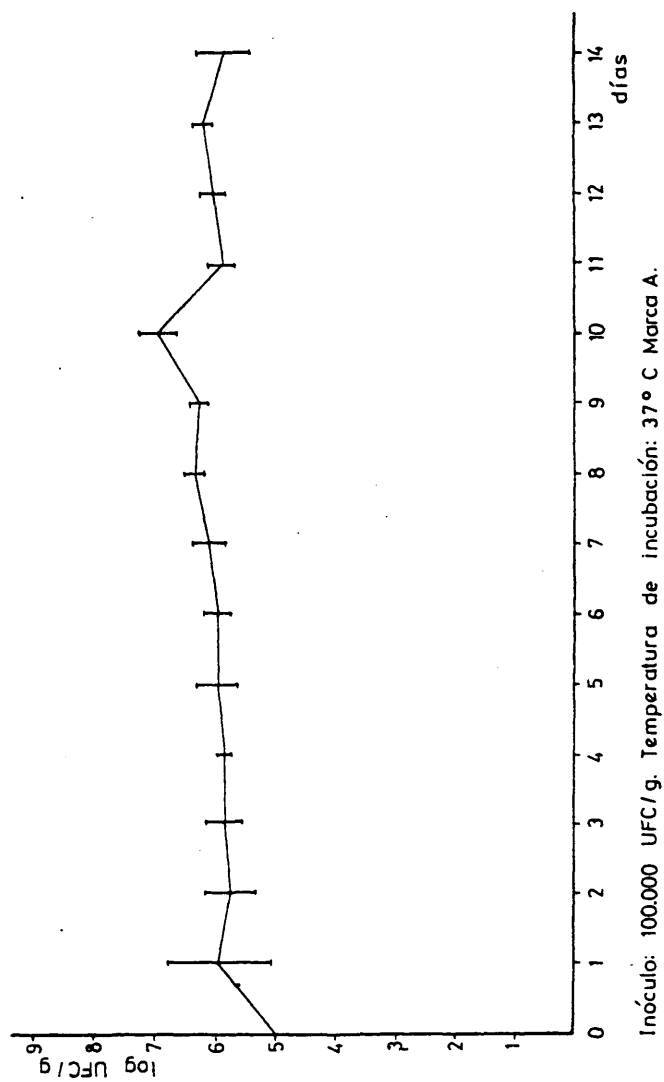


Figura RL 8: Representación gráfica del desarrollo de *S. aureus* cepa 472 en leche condensada en un periodo de 14 días de incubación.

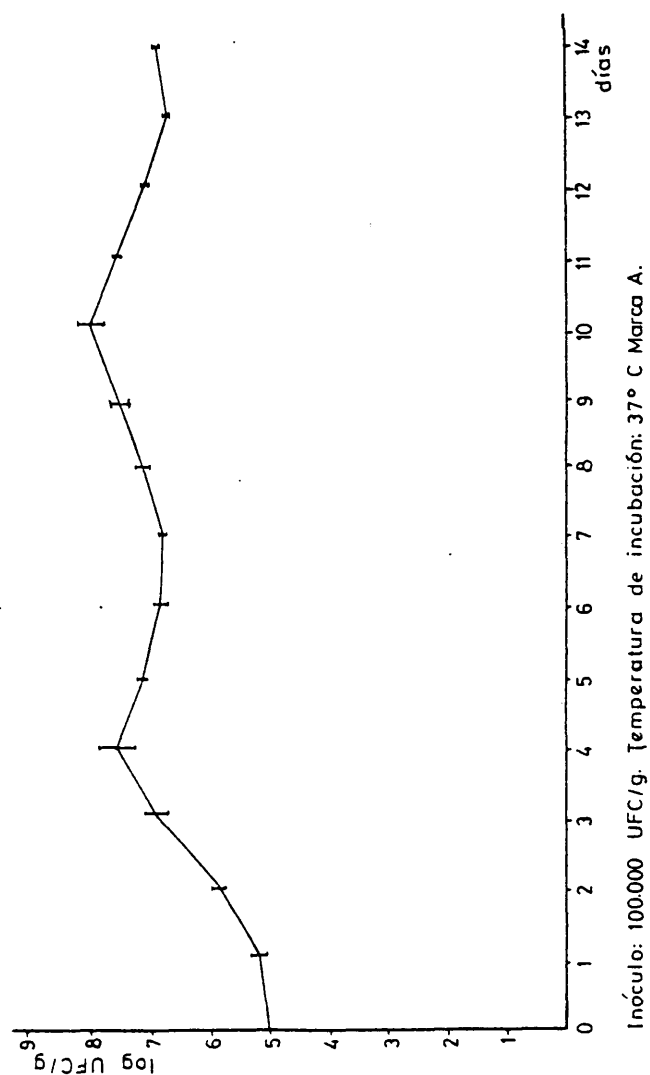


Figura RL 9: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de la leche condensada sobre el desarrollo de *S.aureus* cepa S-6 a diferentes temperaturas.

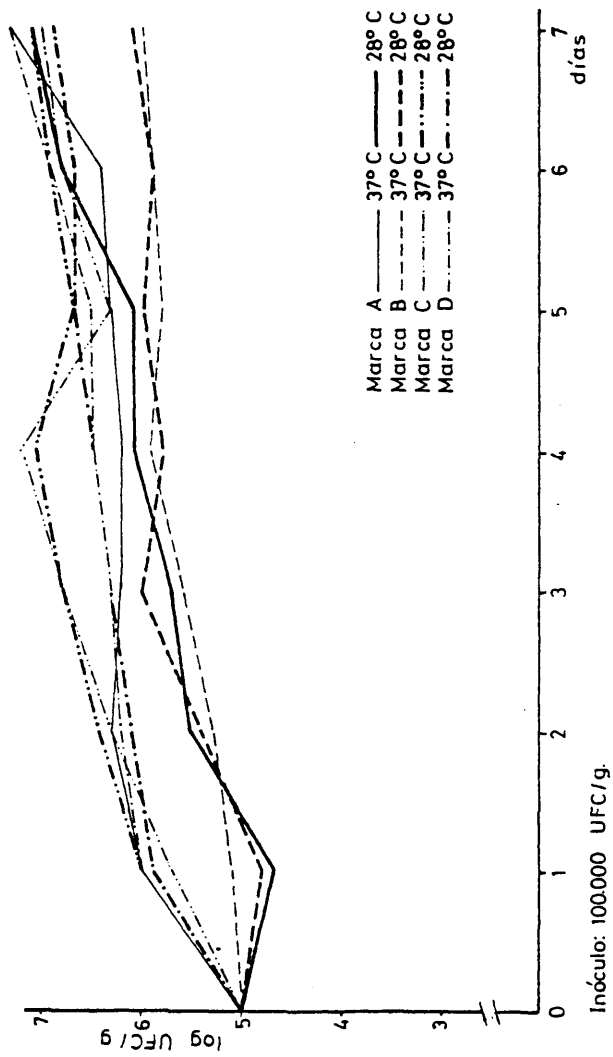


Figura RL 10: Representación gráfica de la influencia de la marca de leche condensada sobre el desarrollo de S.aureus cepa 100 a diferentes temperaturas.

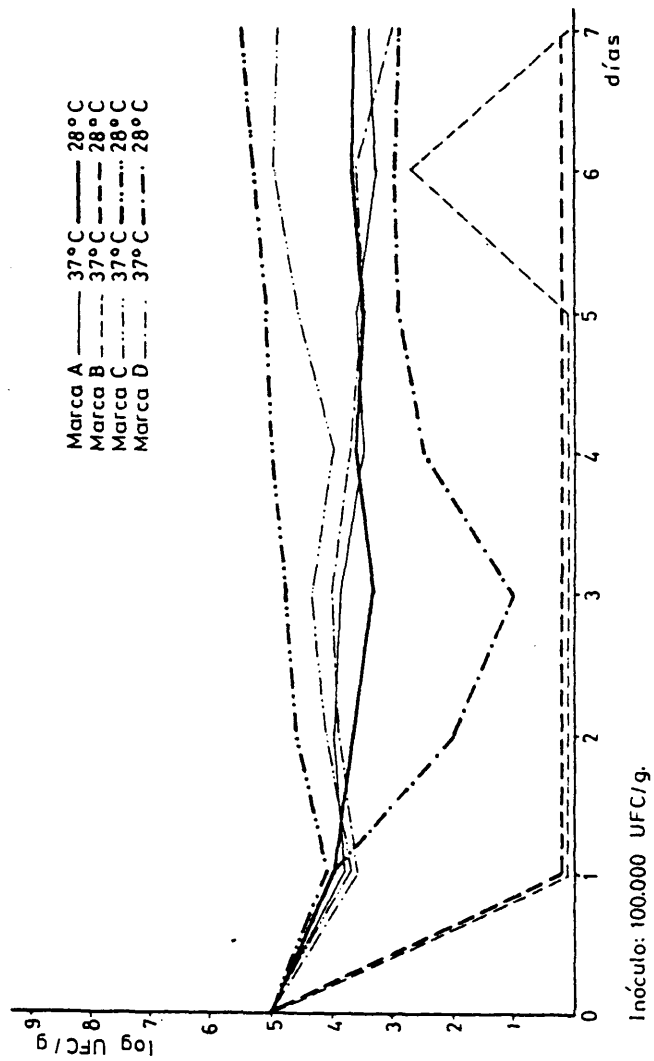


Figura RL 11: Representación gráfica de la influencia de la marca de leche condensada sobre el desarrollo de *S. aureus* cepa 137 a diferentes temperaturas.

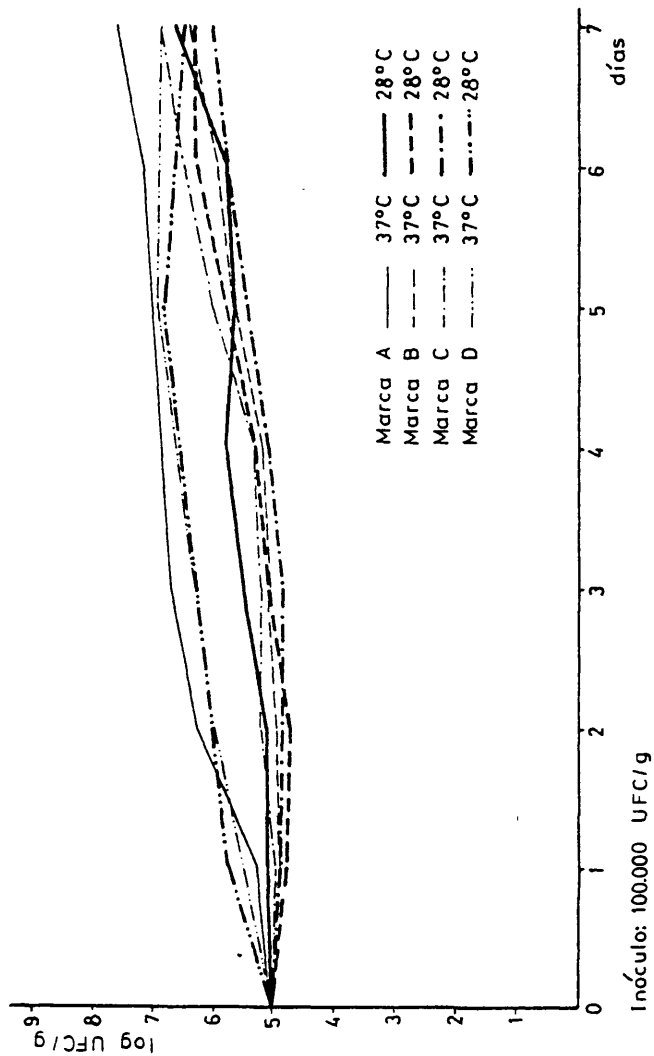


Figura RL 13: Representación gráfica de la influencia de la marca de leche condensada sobre el desarrollo de S.aureus cepa 326 a diferentes temperaturas.

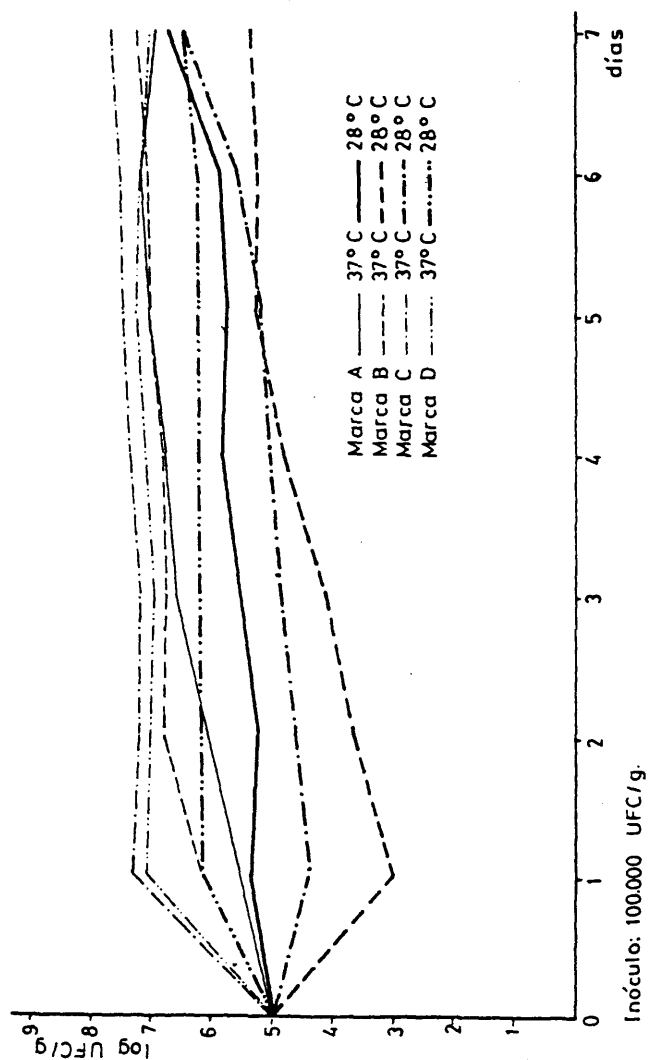


Figura RL 14: Representación gráfica de la influencia de la marca de leche condensada sobre el desarrollo de *S. aureus* cepa 379 a diferentes temperaturas.

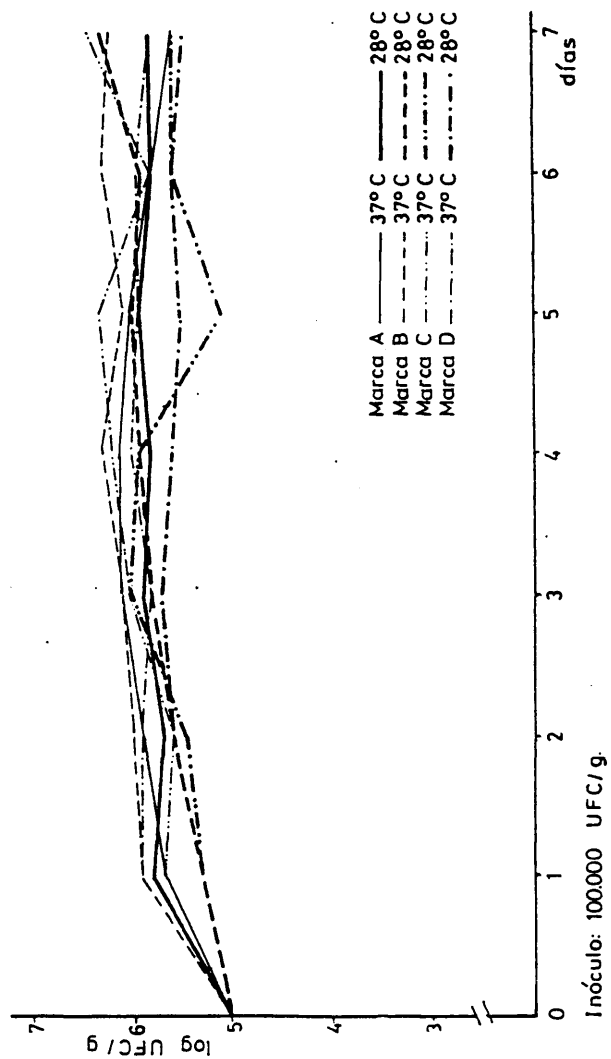


Figura RL 15: Representación gráfica de la influencia de la marca de leche condensada sobre el desarrollo de S.aureus cepa 472 a diferentes temperaturas.

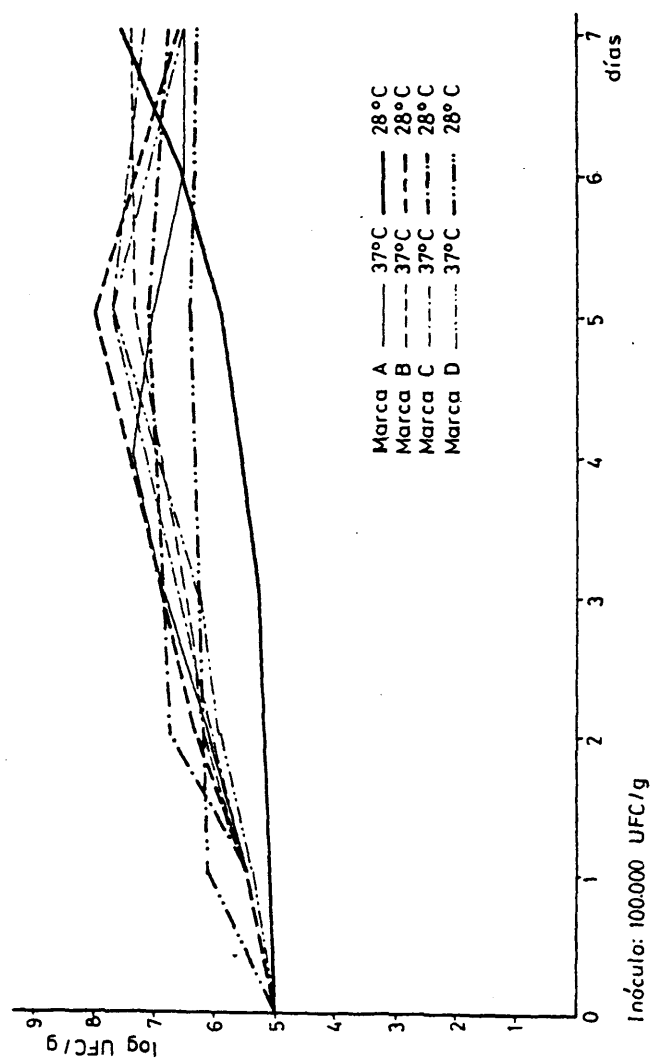


Figura RL 16: Representación gráfica de la influencia del inóculo sobre el desarrollo de S.aureus cepa S-6 en leche condensada.

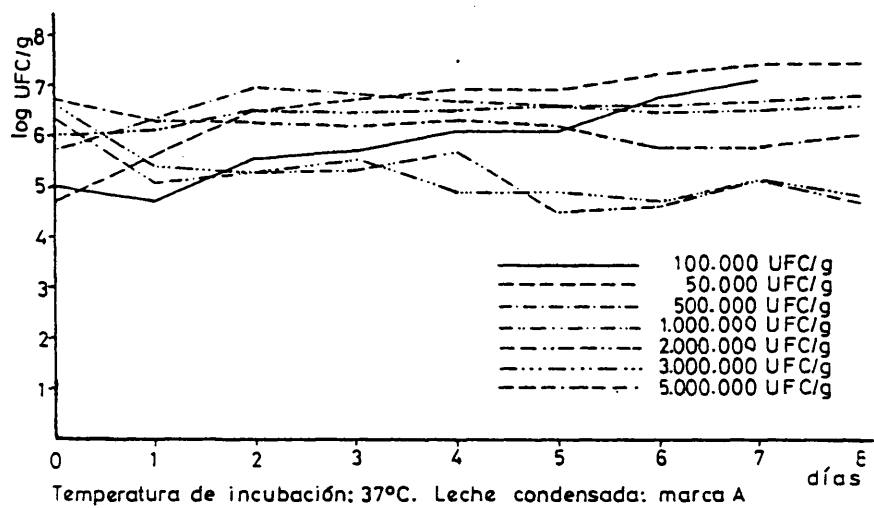


Figura RL 17: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de S.aureus cepa S-6 en leche condensada.

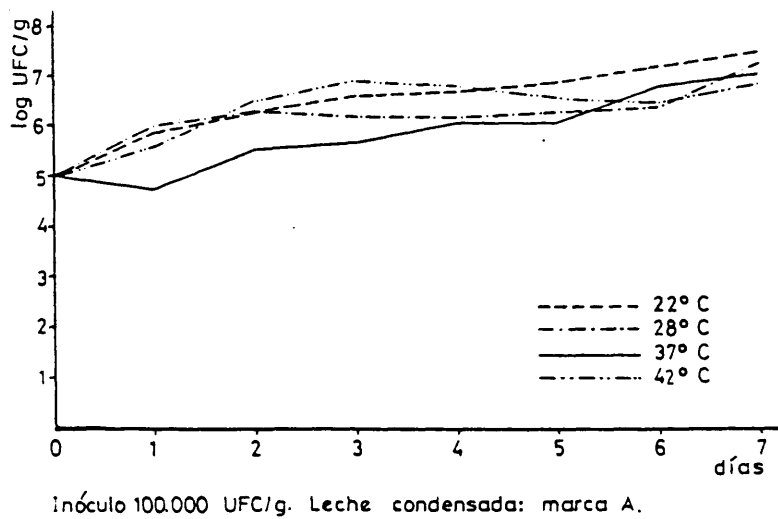


Figura RL 18: Representación gráfica de la influencia del inóculo sobre el desarrollo de S.aureus cepa 100 en leche condensada.

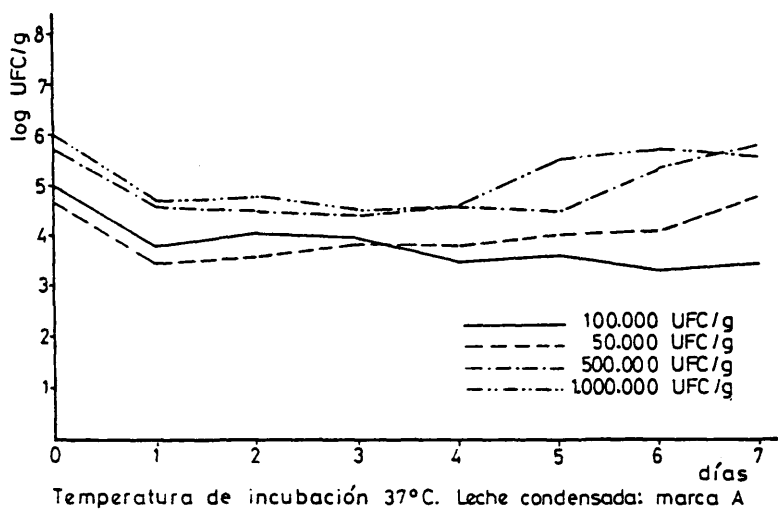


Figura RL 19: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de S.aureus cepa 100 en leche condensada.

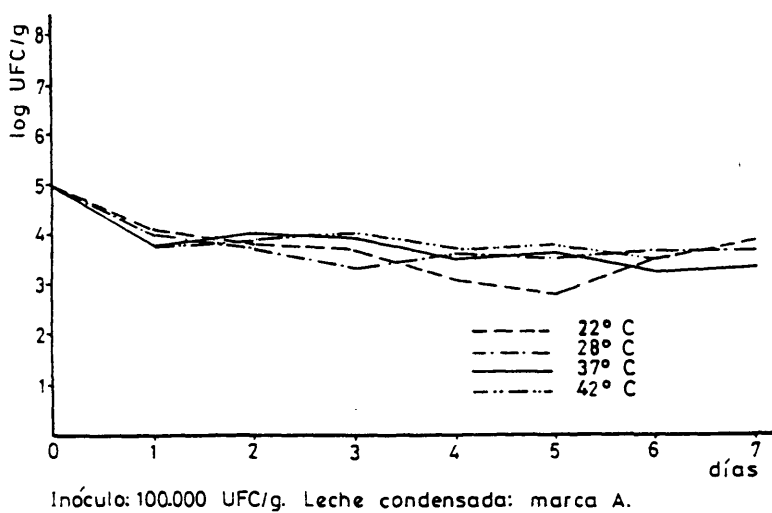


Figura RL 20: Representación gráfica de la influencia del inóculo sobre el desarrollo de S. aureus cepa 137 en leche condensada.

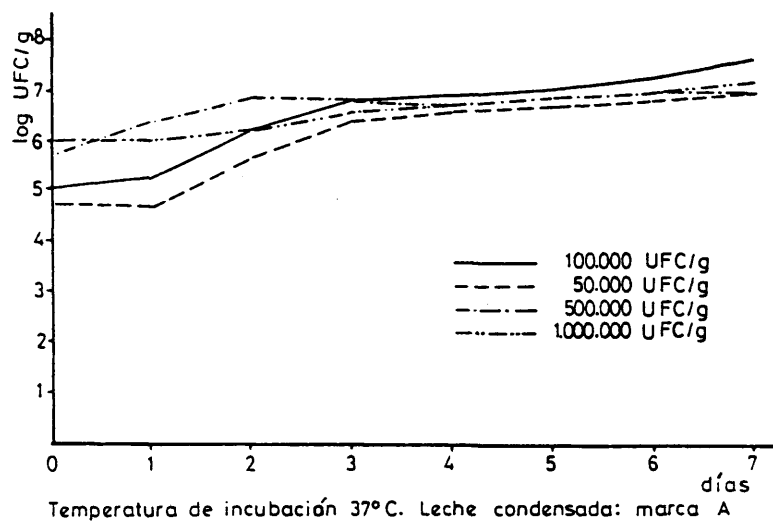


Figura RL 21: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de S. aureus cepa 137 en leche condensada.

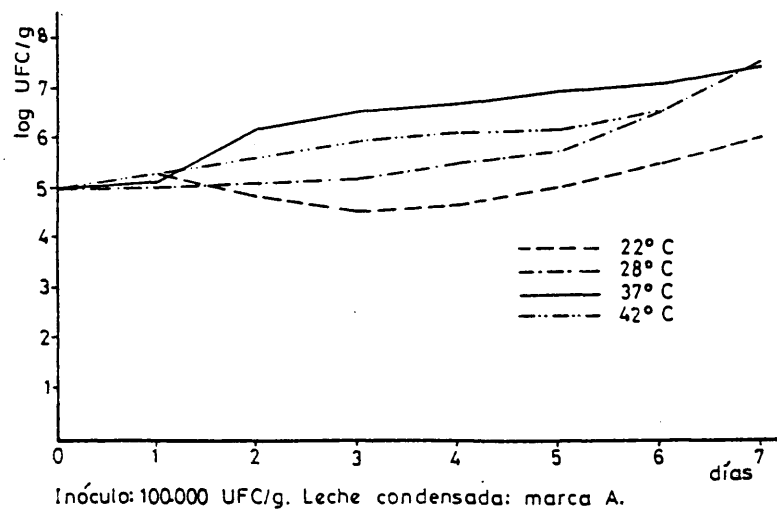


Figura RL 22: Representación gráfica de la influencia del inóculo sobre el desarrollo de S.aureus cepa 161 en leche condensada.

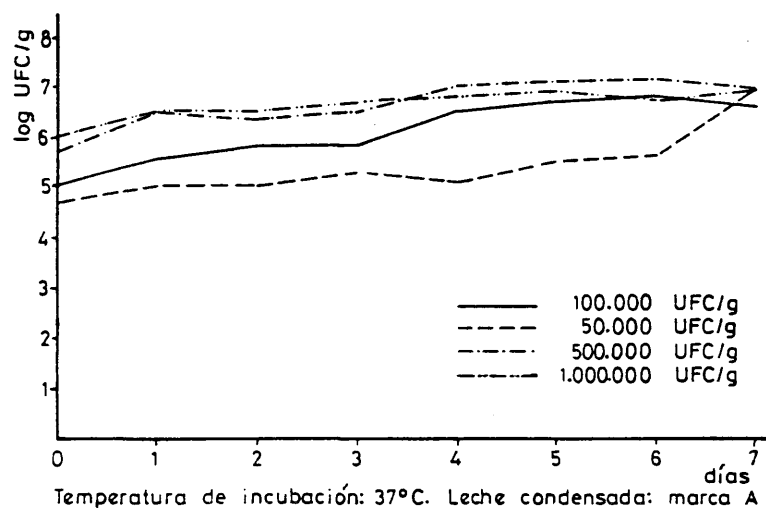


Figura RL 23: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de S.aureus cepa 161 en leche condensada.

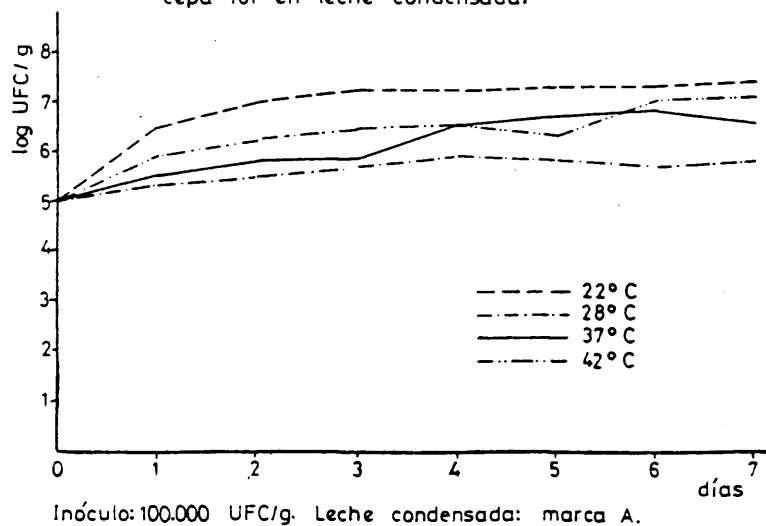


Figura RL 24: Representación gráfica de la influencia del inóculo sobre el desarrollo de S. aureus cepa 196 E en leche condensada.

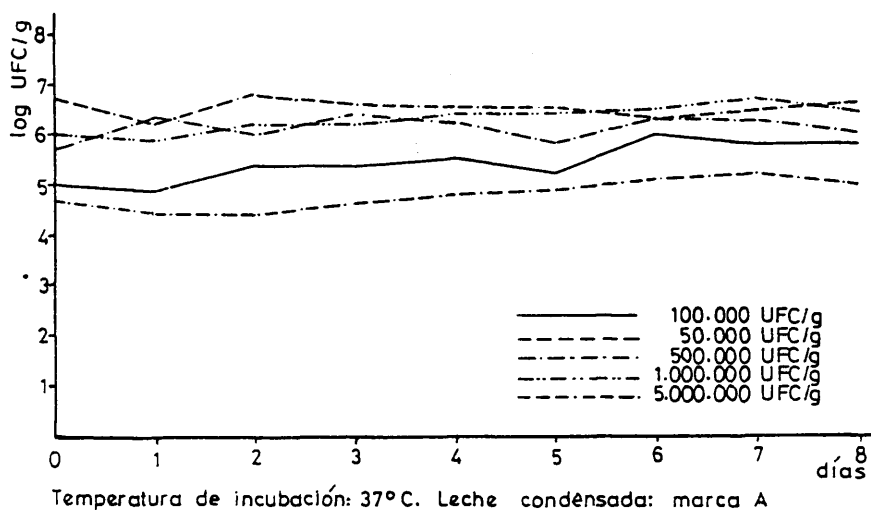


Figura RL 25: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de S. aureus cepa 196 E en leche condensada.

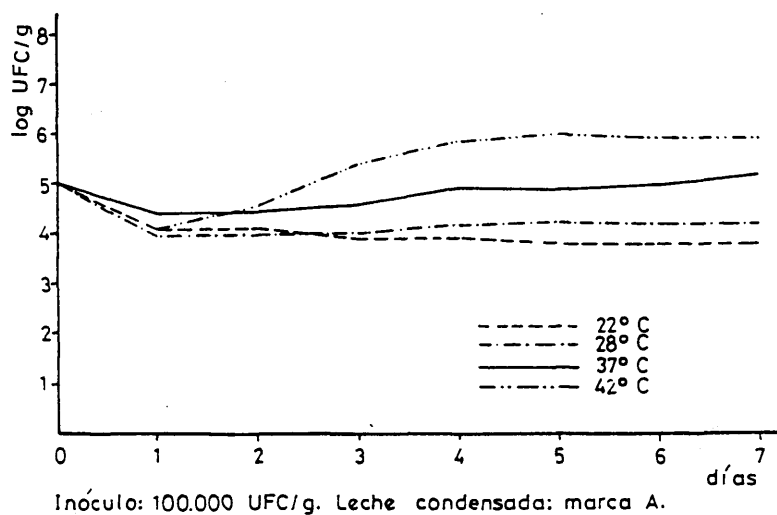


Figura RL 26: Representación gráfica de la influencia del inóculo sobre el desarrollo de S.aureus cepa 326 en leche condensada.

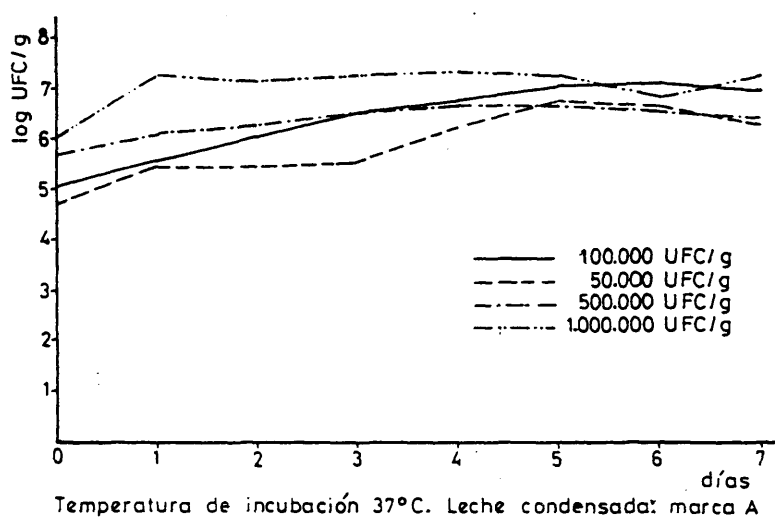


Figura RL 27: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de S.aureus cepa 326 en leche condensada.

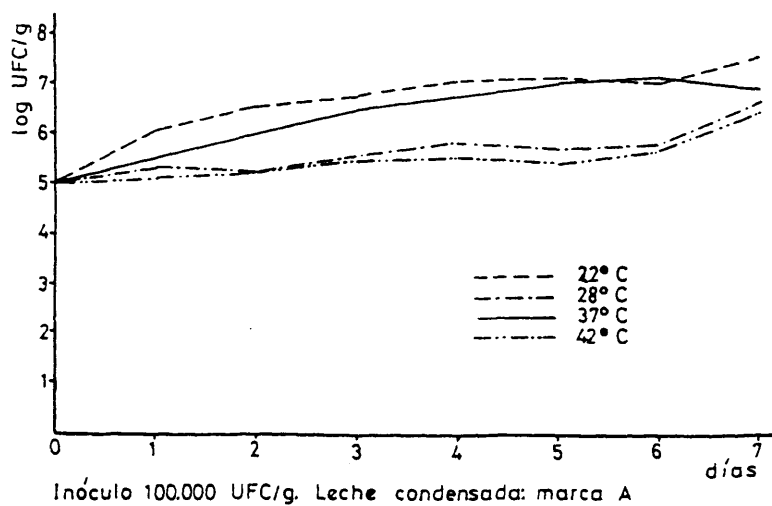


Figura RL 28: Representación gráfica de la influencia del inóculo sobre el desarrollo de S.aureus cepa 379 en leche condensada.

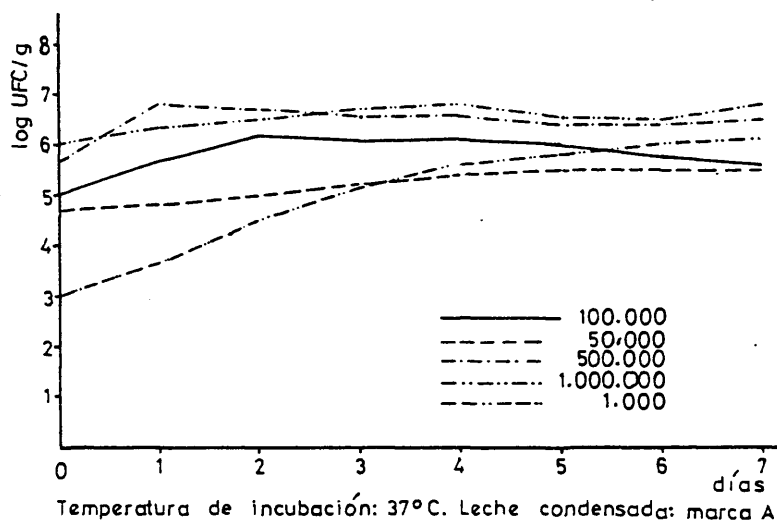


Figura RL 29: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de S.aureus cepa 379 en leche condensada.

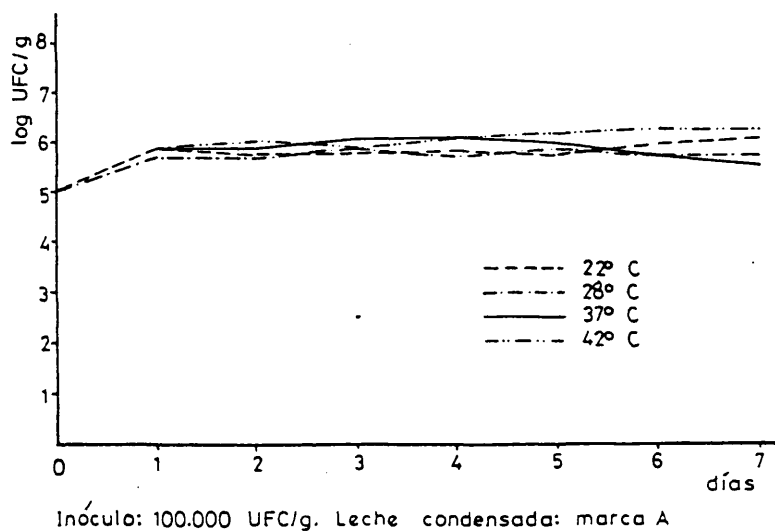


Figura RL 30: Representación gráfica de la influencia del inóculo sobre el desarrollo de S. aureus cepa 472 en leche condensada.

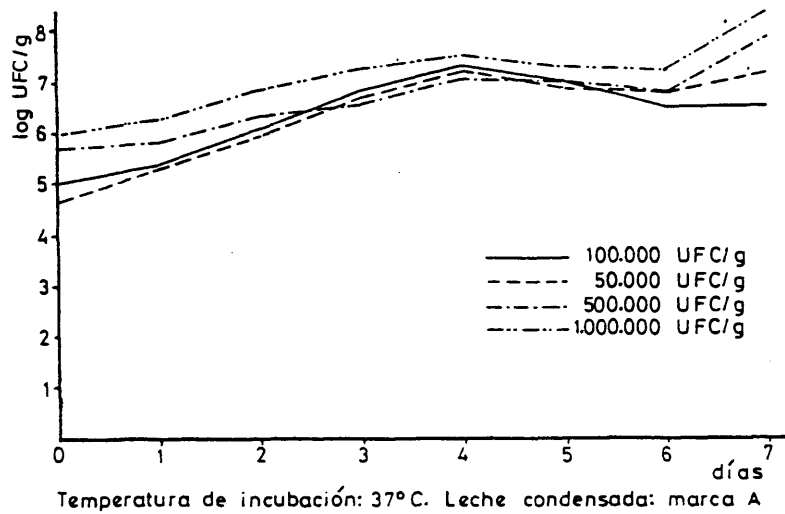


Figura RL 31: Representación gráfica de la influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de S. aureus cepa 472 en leche condensada.

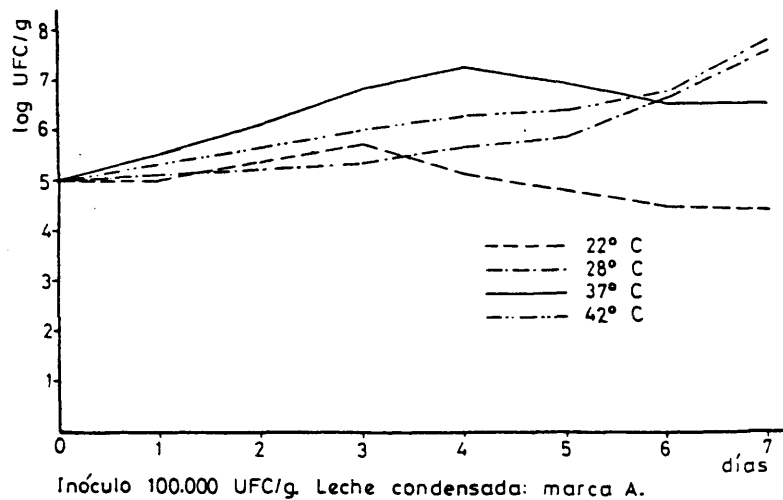


Figura RL 32: Comparación del valor medio del logaritmo de las UFC/g computadas en un período de 7 días en leche condensada de cuatro marcas diferentes incubadas a 28°C y a 37°C.

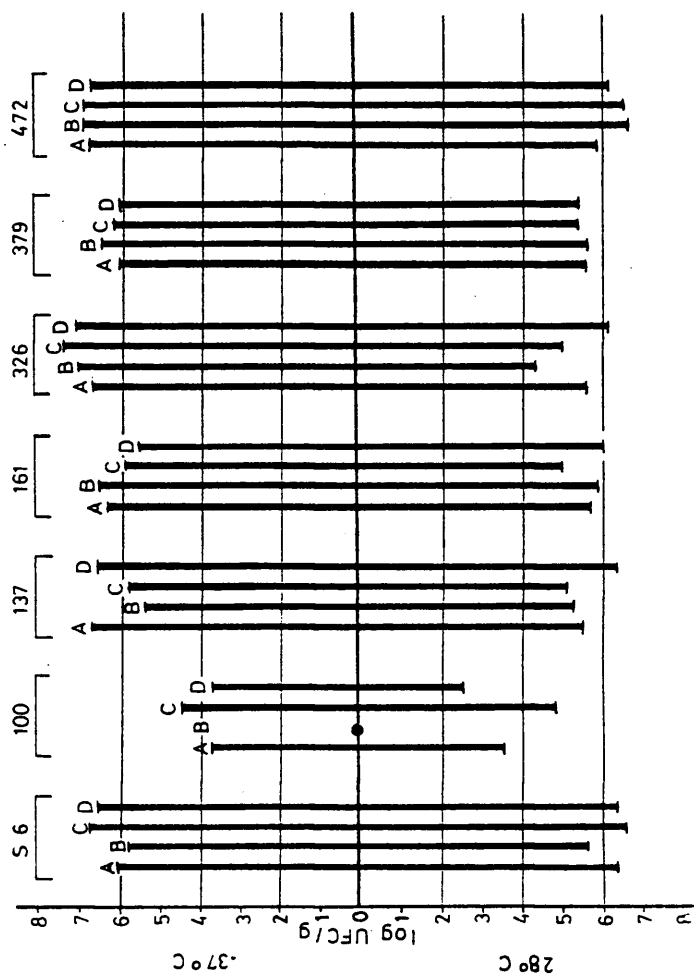
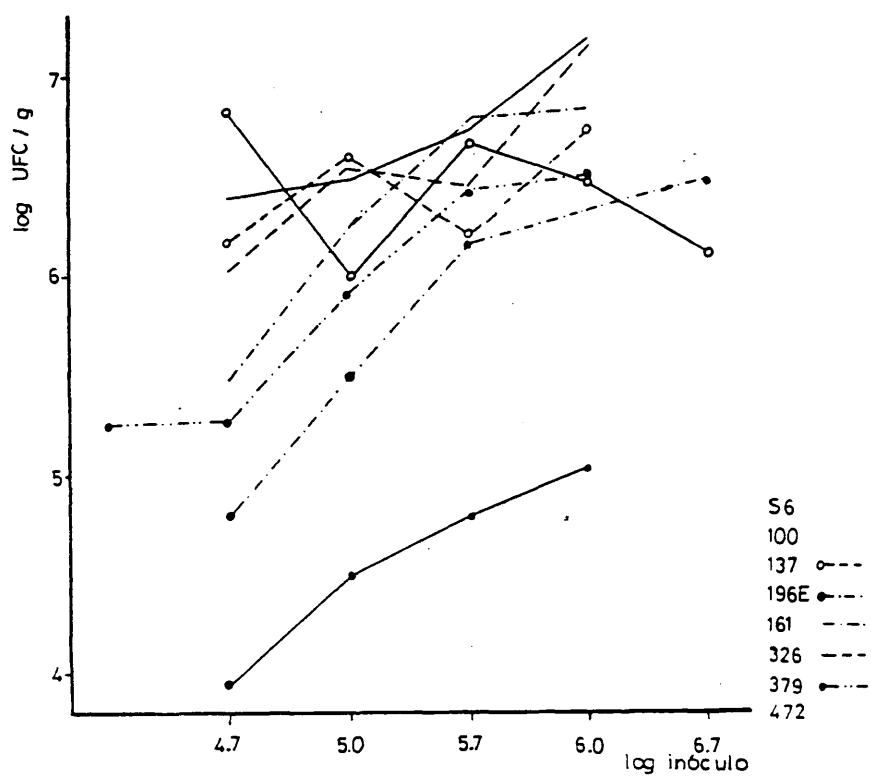


Figura RL33: Valores medios del logaritmo de UFC/g obtenidos en las muestras de leche condensada inoculadas con distintas concentraciones de cada cepa.



Temperatura de incubación: 37°C Leche condensada: Marca A

Tabla RL1: Enterotoxina detectada a lo largo de 14 días en las muestras de
leche condensada

Cepa	Días de incubación									
	4		7		11		14			
	log UFC/ml	EET/mp	log UFC/ml	EET/mp	log UFC/ml	EET/mp	log UFC/ml	EET/mp		
S6	4.5	0/2	6.7	1/2	5.8	2/2	5.9	0/2		
100	3.3	0/2	3.8	0/2	4.6	0/2	5.5	0/2		
137	6.8	1/2	7.1	2/2	7.2	2/2	7.1	0/2		
161	5.9	0/2	6.1	1/2	5.7	0/2	6.1	1/2		
326	6.8	0/2	6.6	1/2	6.8	1/2	6.9	0/2		
379	5.6	0/2	5.8	1/2	6.1	2/2	5.8	0/2		
472	7.0	0/2	6.5	1/2	7.1	2/2	7.0	1/2		

EET/mp: Tras la barra se indica el número total de muestras; delante de la barra las muestras positivas a la enterotoxina estudiada.

Inóculo: 100.000 UFC/ml. Temperatura de incubación: 37 C. Leche condensada Marca A.

Tabla RL2: Evolución a lo largo de 14 días de la actividad DNasa y TNasa detectada en las muestras de leche condensada.

Cepa	Días de incubación											
	4				7				11			
	log UFC/ml	DNasa	TNasa	log UFC/ml	log UFC/ml	DNasa	TNasa	log UFC/ml	log UFC/ml	DNasa	TNasa	log UFC/ml
S6	4.5	0.7	0.7	6.7	0.9	0.8	0.8	5.8	0.8	0.8	0.8	5.9
100	3.3	0.7	0.7	3.8	0.9	0.8	0.8	4.6	0.8	0.8	0.8	5.5
137	6.8	1.1	1.1	7.1	1.1	1.1	1.1	7.2	1.2	1.3	1.3	7.1
161	5.9	0.8	0.8	6.1	1.0	1.0	1.0	5.7	0.7	0.7	0.85	6.1
326	6.8	0.8	0.8	6.6	0.9	0.8	0.8	6.8	0.9	0.8	1.1	6.9
379	5.6	0.9	0	5.8	0.7	0.9	0.9	6.1	1.0	0.9	0.7	5.8
472	7.0	0.9	0.9	6.5	1.0	0.9	0.9	7.1	1.3	1.2	1.2	7.0

Los diámetros de la actividad DNasa y TNasa se expresan en cm.
 Inóculo: 100.000 UFC/ml. Temperatura de incubación: 37 C. Leche condensada Marca A.

Tabla RL3: Enterotoxina detectada en las cuatro marcas de leche condensada inoculada con las diferentes cepas y a las dos temperaturas experimentales.

M	T		S6	100	137	161	326	379	472
A	28°C	log UFC/ml	6.39	3.64	5.9	5.67	5.71	5.81	5.93
		EET	0/2	0/2	2/2	1/2	0/2	0/2	1/2
	37°C	log UFC/ml	6.0	3.64	6.63	6.24	6.54	5.89	6.64
		EET	1/2	0/2	2/2	1/2	1/2	1/2	1/2
B	28°C	log UFC/ml	5.66	0	5.49	5.94	4.48	5.83	6.84
		EET	0/2	0/2	2/2	0/2	0/2	NE	1/2
	37°C	log UFC/ml	5.77	0	5.31	6.39	6.8	6.13	6.79
		EET	1/2	0/2	1/2	2/2 ^(a)	0/2	NE	2/2
C	28°C	log UFC/ml	6.6	4.9	5.2	5.16	5.14	5.57	6.73
		EET	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	NE	2/2
	37°C	log UFC/ml	6.71	4.37	5.78	5.8	7.36	6.0	6.8
		EET	2/2	0/2	2/2	1/2	1/2	NE	2/2
D	28°C	log UFC/ml	6.44	3.62	6.41	6.1	6.2	5.54	6.34
		EET	0/2	0/2	0/2	1/2 ^(b)	0/2	NE	1/2
	37°C	log UFC/ml	6.53	2.62	6.49	5.39	7.07	5.89	6.6
		EET	2/2	0/2	0/2	0/2	1/2	NE	0/2

NE: No estudiado

(a): 57 ng/100g

(b): 60 ng/100g

EET: tras la barra se indica el número total de muestras, delante de la barra las muestras positivas a la enterotoxina estudiada. Inóculo: 100.000 UFC/ml. Tiempo de incubación: 7 días.

M: Marca de leche condensada. T: temperatura de incubación.

Tabla RL4: Actividad DNasa y TNasa habidas en las cuatro marcas de leche condensada inoculada con las diferentes cepas y a las dos temperaturas experimentales.

			S6	100	137	161	326	379	472
M	T								
A	28°C	log UFC/ml	6.39	3.64	5.9	5.67	5.71	5.81	5.93
		DNasa	1.0	0	1.0	0.9	1.1	1.0	0.7
		TNasa	0.9	0	0.9	0.9	1.0	1.0	0.7
	37°C	log UFC/ml	6.0	3.64	6.63	6.24	6.54	5.89	6.64
		DNasa	0.9	0	1.1	0.9	1.0	0.7	1.0
		TNasa	0.8	0	1.1	0.9	0.9	0.9	0.9
B	28°C	log UFC/ml	5.66	0	5.49	5.94	4.48	5.83	6.84
		DNasa	NE	0	0.9	0.9	1.0	0.7	0.8
		TNasa	NE	0	1.0	0.9	0	0.7	0.75
	37°C	log UFC/ml	5.77	0	5.31	6.39	6.8	6.13	6.79
		DNasa	NE	0	1.0	0.9	0.9	0.7	1.0
		TNasa	NE	0	0.8	0.9	0.7	0.8	1.0
C	28°C	log UFC/ml	6.6	4.9	5.2	5.16	5.14	5.57	6.73
		DNasa	NE	0.9	0.95	0.7	0.9	0.9	0.85
		TNasa	NE	0	1.0	0.7	0	0.7	0.85
	37°C	log UFC/ml	6.71	4.37	5.78	5.8	7.36	6.0	6.8
		DNasa	NE	0.9	1.1	0.9	1.2	1.1	1.05
		TNasa	NE	0.7	1.0	0.9	0.9	0.7	1.05
D	28°C	log UFC/ml	6.44	3.62	6.41	6.1	6.2	5.54	6.34
		DNasa	NE	0	1.1	0.9	0.8	0.8	0.7
		TNasa	NE	0	0.9	0.7	0.8	0.7	0.7
	37°C	log UFC/ml	6.53	2.62	6.49	5.39	7.07	5.89	6.6
		DNasa	NE	0	1.1	0.7	0.9	0.9	0.8
		TNasa	NE	0	0.9	0	0.9	0.9	0.8

NE: No estudiado.

Los diámetros de la actividad DNasa y TNasa se expresan en cm. C: diámetro del halo inferior a 0.6 cm. M: Marca de leche condensada. T: temperatura de incubación.

Inóculo: 100.000 UFC/ml. Tiempo de incubación: 7 días.

Tabla RL5: Enterotoxina detectada al inocular las muestras de leche condensada con las distintas concentraciones de cada cepa.(UFC/ml).

Cepa	Inóculo (UFC/ml)											
	5 x 10 ⁴		1 x 10 ⁵		5 x 10 ⁵		1 x 10 ⁶		5 x 10 ⁶		1 x 10 ³	
	log UFC/ml	EET	log UFC/ml	EET	log UFC/ml	EET	log UFC/ml	EET	log UFC/ml	EET	log UFC/ml	EET
56	6.82	2/2	6.0	1/2	6.69	1/2	6.47	1/2	6.11	0/2		
100	3.96	0/2	3.7	0/2	4.8	0/2	5.04	0/2				
137	6.19	1/2	6.61	2/2	6.2	2/2	6.83	2/2				
161	5.49	1/2(a)	6.24	1/2	6.77	2/2	6.73	1/2(b)				
196E	4.8	0/2	4.8	0/2	6.17	0/2	6.34	0/2	6.5	1/2		
326	6.03	1/2	6.54	1/2	6.45	0/2	7.17	0/2				
379	5.27	0/2	5.93	1/2	6.55	1/2	6.6	1/2			5.24	0/2
472	6.42	1/2	6.49	1/2	6.74	2/2	7.2	2/2				

(a) 53.5 ng/100ml

(b) 57.5 ng/100ml

EET: tras la barra se indica el número total de muestras, delante de la barra las muestras positivas a la enterotoxina estudiada. Temperatura de incubación : 37°C. Tiempo de incubación: 7 días. Leche

Tabla RL6: Actividad DNasa y TNasa detectada al inocular las muestras de leche condensada con las distintas concentraciones de cada cepa (UFC/ml).

Cepa	Inóculo (UFC/ml)											
	5 x 10 ⁴			1 x 10 ⁵			5 x 10 ⁵			1 x 10 ⁶		
	log UFC/ml	DNasa	TNasa	log UFC/ml	DNasa	TNasa	log UFC/ml	DNasa	TNasa	log UFC/ml	DNasa	TNasa
S6	6.82	1.0	1.0	6.0	0.9	0.8	6.69	0.7	0.7	6.47	0.7	0.7
100	3.96	-	-	3.7	-	-	4.8	-	-	5.04	-	-
137	6.19	1.0	1.1	6.61	1.1	1.1	6.2	1.3	1.1	6.83	1.3	1.1
161	5.49	0.7	0.9	6.24	0.9	0.9	6.77	0.9	1.1	6.73	0.9	1.1
196E	4.8	-	-	4.8	-	-	6.17	0.9	0.9	6.34	0.9	1.0
326	6.03	1.0	0.9	6.54	1.0	0.9	6.45	1.0	1.0	7.17	1.1	1.0
379	5.27	0.9	0.9	5.93	0.7	0.9	6.55	1.0	1.0	6.6	1.1	0.9
472	6.42	1.1	0.9	6.49	1.0	0.9	6.74	0.9	1.0	7.2	1.0	0.9
										5.24	0.7	0.7

Los diámetros de la actividad DNasa y TNasa se expresan en cm.

(-): diámetro del halo menor de 0.6 cm.

Temperatura de incubación: 37°C. Tiempo de incubación: 7 días . Leche condensada marca A.

Tabla RL7: Enterotoxina detectada en las muestras de leche condensada incubadas a las cuatro temperaturas experimentales.

Cepa	Temperatura de incubación							
	22°C		28°C		37°C		42°C	
	log UFC/ml	EET/mp	log UFC/ml	EET/mp	log UFC/ml	EET/mp	log UFC/ml	EET/mp
56	6.7	0/2	6.4	0/2	6.0	1/2	6.6	2/2
100	3.5	0/2	3.7	0/2	3.7	0/2	3.8	0/2
137	5.2	0/2	5.9	2/2	6.6	2/2	6.3	2/2
161	7.1	2/2	5.7	1/2	6.2	1/2	6.5	1/2
196E	3.9	0/2	4.2	0/2	4.8	0/2	5.4	0/2
326	6.9	0/2	5.7	0/2	6.5	1/2	5.6	0/2
379	5.9	0/2	5.8	0/2	5.9	1/2	6.1	1/2
472	5.0	0/2	5.8	1/2	6.5	1/2	6.3	2/2

EET/mp: tras la barra se indica el número total de muestras, delante de la barra las muestras positivas a la enterotoxina estudiada. Inóculo: 100.000 UFC/ml. Leche condensada Ilarca A. Tiempo de incubación: 7 días.

las restantes cepas, excepción hecha de la 100, el crecimiento, si bien había experimentado un incremento de un ciclo logarítmico en las primeras 48 h, esta fase no fue tan notable. La cepa 100 presentó una disminución inicial, recuperando valores similares a los hallados con las otras cepas a partir del día 6.

Una vez alcanzada la fase estacionaria, los recuentos obtenidos se mantuvieron entre estrechos límites, no sufriendo oscilaciones superiores a un ciclo logarítmico hasta el final de la experiencia en el día 14.

Las cepas que mostraron un crecimiento más elevado fueron la 472 y la 137, correspondiendo el desarrollo más pobre a la cepa 100.

Tras 14 días, los recuentos continuaron siendo elevados en todas las cepas, oscilando entre 5.5 (cepa 161) y 7.6 (137). Sin embargo, tras 30 días no se registraron células estafilocócicas con actividad vital en las mayonesas que no fueron diluidas, sino que el inóculo estafilocócico fue depositado asépticamente en el interior del bote.

En la tabla RL1 se aprecia el número de muestras positivas detectadas en los días 4, 7, 11 y 14 de incubación a 37°C en la marca A. En dicha tabla se aprecia que 4 días parecen ser insuficientes para que se sintetice enterotoxina en leche condensada en niveles detectables por el método del

microporta. Sin embargo, la mayoría de las muestras positivas tuvieron lugar entre los días 7 y 11, apreciándose un menor número de positividad en el día 14.

B.2. INFLUENCIA DE LA MARCA

En las figuras RL9 a RL16, así como en la figura RL33 y en las tablas RL3 y RL4 se expresa el crecimiento con diferentes marcas. Por lo general, se aprecia que el crecimiento es similar, siendo en la mayoría de los casos superior a 37°C que a 28°C, pero no pudiendo hacerse extensivo para todas las cepas ni para todas las marcas. Es importante señalar el extraño comportamiento de la cepa 137 que alcanzó su desarrollo óptimo al ser incubada a 28°C con la marca D (una leche descremada).

Cabe resaltar el comportamiento atípico de la cepa 100 al ser inoculada en la marca B, no registrándose crecimiento alguno ni siquiera a las 24 h.

El valor máximo obtenido correspondió a la cepa 326, a 37°C, en la marca C, siendo los valores mínimos los correspondientes a la cepa 100. Los valores medios globales habidos en cada temperatura y con cada marca se representan en la figura RL32.

La enterotoxina producida en cada una de las marcas, al ser

inoculada con las distintas cepas e incubadas tanto a 28 como a 37 °C se muestra en la tabla RL3. En términos globales, el mayor número de muestras positivas (detectadas por el método del "microporta") ha acontecido en la marca C con 45.8% de las muestras positivas. También ha sido notorio el porcentaje de positividad en la marca A (39.3%). Sin embargo, en la marca D, que, como ya se hizo constar anteriormente, es un tipo de leche condensada descremada, tan sólo 20.8% de las muestras fueron positivas. Esta disminución del porcentaje de muestras en las que se detectó enterotoxina es especialmente marcado a 37 °C donde, tal y como se aprecia en dicha tabla, sólo 3 muestras mostraron esta característica.

Las muestras de leche condensada que resultaron positivas con mayor frecuencia fueron aquéllas correspondientes a las inoculadas con las cepas 137 y 472, en ambos casos con un porcentaje de positividad de 62.5%. Por otra parte, la cepa 100 no ocasionó ninguna muestra en la que la enterotoxina A fuera detectable.

B.3. INFLUENCIA DEL INÓCULO SOBRE EL DESARROLLO DE *S.aureus*

En las figuras RL15, RL18, RL20, RL22, RL24, RL26, RL28 y RL30 y en las tablas RL5 y RL6 se representa cómo afectó la concentración de la suspensión inicial de cada cepa de estafilococos a lo largo del periodo de incubación. Independientemente del inóculo, el crecimiento fue

exponencial hasta el día 4, en el que se estabilizó la fase estacionaria en una cifra de alrededor de 10^6 a 10^7 UFC/g, excepto en el caso de la cepa 472 en el que fue de 10^7 a 10^8 . La fase lag o de aclimatación inicial es bastante marcada en la mayoría de las cepas, menos en la S6.

De estas figuras se puede desprender que existe una cierta relación entre el valor inicial del inóculo y la concentración en cada día, hecho que se hace más evidente en las tablas RL5 y RL6. En la tabla se expresan los valores medios habidos en cada concentración de inóculo para cada cepa. La media global, independientemente de las cepas objeto de estudio, para cada uno de los valores de inóculo son los que a continuación se detallan:

INOCULO	log UFC/g	Desviación típica
* 1×10^3	5.24	
* 5×10^4	5.62	0.876
* 1×10^5	5.79	0.967
* 5×10^5	6.30	0.605
* 1×10^6	6.56	0.637
* 5×10^6	6.30	0.195

En todas las cepas, excepto en la S6 que se comportó de una forma realmente atípica, la media de la concentración de UFC/g fue incrementando con el valor del inóculo inicial.

La cepa 379 fue incorporada a dos muestras de leche

condensada a la concentración inicial de 1.000 UFC/g a fin de ver el efecto de inóculos pobres sobre el desarrollo. Como se aprecia en la figura RL28, tras 24 h se habían desarrollado 4 ó 5 generaciones, tras 48 h 31-32 generaciones, y al tercer día, la cifra de UFC ya había superado 100.000 por gramo. El ritmo de crecimiento es muy inferior con inóculos más fuertes, alcanzándose antes la fase estacionaria.

Igualmente se estudió un inóculo de 5.000.000 UFC/g con las cepas S6 (figura RL16) y 196E (figura RL24). Ya hemos indicado que la cepa S6 se comportó de forma atípica, obteniéndose que con dicho inóculo la media resultante fue de 6.11, es decir, inferior a la obtenida cuando el inóculo era de 1.000.000 UFC/g. Por el contrario, con la cepa 196E y con un inóculo de 5.000.000 UFC/g el valor medio correspondió a 6.5, superior en este caso a todos los demás estudiados. No obstante, en ambos casos, disminuyó el número de UFC/g con respecto al inicial.

La cinética de la reacción fue diferente para cada cepa. Así, en la 100 y tras disminuir los recuentos aproximadamente un ciclo logarítmico el primer día, en los sucesivos se estabilizaron los valores de recuento en cifras aproximadamente similares. En la cepa 137, los valores no se igualaron hasta el día 3 y en la 161 esto no ocurrió hasta el séptimo día. En las cepas 326 y 379 se registraron cifras similares de recuento ya en el día 5, mientras que en la 472 fue en el día 4.

Con una concentración inicial de estafilococos de 5×10^5 se detectó enterotoxina presente en 8 de las 16 muestras inoculadas. Esta proporción fue inferior en los otros inóculos, ya que tanto con una concentración inicial de 1×10^5 como de 1×10^6 se detectaron 7 muestras positivas con cada valor de inóculo, y 6 en las 16 muestras en las que el inóculo fue de 5×10^4 . Cuando los estafilococos se agregaron a la leche condensada en la concentración de 1.000 UFC/g no se pudo constatar la presencia de enterotoxina.

B.4. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION

La influencia que ejerce este parámetro sobre el desarrollo de las distintas cepas de S. aureus se representa de forma gráfica en las figuras RL 17, RL19, RL21, RL23, RL25, RL27, RL29 y RL31, así como en las tablas RL7 y RL8. De las tablas se desprende que en términos globales las temperaturas óptimas de crecimiento han sido 42 y 37 C (siendo la media del logaritmo de UFC/ml 5.825 y 5.775 y la desviación típica 0.850 y 0.951, respectivamente), si bien también ha sido abundante a las temperaturas de 22 (5.525) y 28°C (5.4). El tratamiento estadístico de comparación de dos medias indica que la diferencia habida entre 37-42 y 22-28 es significativa ($t = 2.588$) entre los límites de confianza del 95%.

El crecimiento fue óptimo a 22°C en tres cepas (S6, 161 y

326), pero resultó peor en cuatro ocasiones (100, 137, 196E y 472). Por lo general, 28 °C fue la temperatura a la que el crecimiento adquirió valores más bajos. Tanto a 37 como 42 °C el crecimiento adquirió valores similares, siendo ligeramente superior en la segunda temperatura. Las cepas 137 y 472 crecieron mejor a 37 °C que a las otras temperaturas, mientras que la S6 fue la cepa que creció peor a esta temperatura. Cuarenta y dos °C fue la temperatura óptima de crecimiento de las cepas 100, 196E y 379 y la peor de la cepa 326.

El valor global más alto alcanzado fue el de la cepa 161, ya que la media alcanzada fue de 7.1 a 22 °C. A 22 °C siempre se obtuvieron valores muy altos de crecimiento en aquellas cepas que crecían bien a esta temperatura (326, 6.9; S6, 6.7).

En cuanto a la cinética del desarrollo, en casi todas las cepas el valor de UFC/g asciende gradualmente en todas las temperaturas por igual, excepto en la cepa 472 en que a 22 °C sube hasta el 3 día, a 37 sube hasta el día 4, para luego disminuir y a 28 y a 42 °C continua incrementando.

En las cepas S6, 100, 137, 196E, 379 y 472 los valores se mantuvieron similares a todas las temperaturas durante el primer y segundo días, a partir de los cuales se manifestaron las diferencias, excepto en la cepa 379 en la que no se han detectado grandes variaciones entre los valores registrados a cada temperatura. En la cepa 161 las cifras de UFC/g fueron diferentes ya desde el primer día y en la 326 se

establecieron dos grupos en los cuales los valores de recuento fueron similares: por un lado el crecimiento adquirió carácter parecido a 22 y a 37°C, mientras que por el otro, a 28 y a 42°C, las cifras registradas fueron parecidas.

El método empleado para la detección de las enterotoxinas estafilocócicas ha sido el de la doble difusión en gel de agar utilizando portaobjetos como soporte. Sólo se observó la producción de enterotoxina en 21 de las 64 (32.8%) muestras examinadas a las cuatro temperaturas diferentes (tabla RL7). A 22°C ninguna cepa produjo enterotoxina en cantidades detectables, excepto en el caso de la cepa 161, en la que como se mencionó más arriba, el crecimiento alcanzó un valor de 12 millones de UFC/g. La temperatura a la que se registró enterotoxina con mayor frecuencia fue 42°C, presente en ocho de las 16 muestras examinadas a esta temperatura. Aquellos casos en los que no se observó enterotoxina coincidió con un bajo nivel de crecimiento de los estafilococos (cepas 100, 196E y 326). En las cepas 161 y 379 correspondió igualmente a la muestra con un valor inferior de UFC/g.

Cuando la temperatura de incubación fue de 37°C se registraron 7 muestras en las cuales se encontraba enterotoxina presente y en nueve no se pudo detectar. Excepto en la cepa 326, en todos los demás casos positivos, también lo fueron a 42°C. En la mencionada cepa el crecimiento fue de más de 3.000.000 de UFC/g a 37°C, mientras que a 42°C fue de

-431-

tan solo 400.000 UFC/g.

Sólo se detectó enterotoxina en 4 de las 16 muestras de leche condensada inoculadas con las diferentes cepas. En todos los casos coincidió con valores de recuento superiores o iguales a 800.000 UFC/g.

C. DISCUSION

- C.1. EFECTO DEL AZUCAR
- C.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA
- C.3. EFECTO DEL INOCULO
- C.4. EFECTO DE LA MARCA DE LECHE CONDENSADA EMPLEADA

La presencia de enterotoxinas en la leche condensada puede tener dos orígenes. Por un lado existe la posibilidad de crecimiento de estafilococos y síntesis de estas toxinas en el producto terminado, cuando se recontamina por estafilococos. Este particular es en el que se basa el presente estudio.

Por otro lado, y gracias a los sistemas actuales de producción de leche condensada, en forma continua, en los que el jarabe de sacarosa se adiciona a la leche antes de su concentración, ya que la tecnología permite luego elevar la temperatura sobre 120° C (evitando así la caramelización), también existe la posibilidad de una contaminación en los tanques de espera, donde la leche se mantiene durante cierto tiempo, previa a la conclusión del procesado. En virtud de las características de termorresistencia de las enterotoxinas, una vez sintetizadas en los tanques podrían superar el proceso de calentamiento y concentración y encontrarse de esta forma presentes en el producto. DONNELLY et al. (1967) indicaron que la mayoría de la leche cruda contenía estafilococos coagulasa positivos, de los que

algunos eran enterotoxigénicos, pudiendo producir enterotoxinas antes de comenzar el procesado.

Según HANSEMANN et al. (1981) valores de actividad de agua inferiores a 0.84 serían una barrera eficaz para impedir el crecimiento de los estafilococos. No obstante, los datos habidos en cuanto la actividad de agua mínima que permite el crecimiento y la síntesis de enterotoxinas son muy variables, probablemente en base a los distintos productos que se han empleado para ajustar dicha actividad de agua. Así, mientras VERRIPS y RHEE (1981) y CHRISTIAN y WALTHO (1962) indicaron que el crecimiento podía darse en actividades de agua inferiores a 0.92, TROLLER (1971) no detectó enterotoxina B en actividades de agua de 0.87, 0.90, 0.93 o 0.96, aunque el número de células excediera de 10^7 /gramo.

NOTERMANS y HEUVELMAN (1983) facilitaron los datos de que la síntesis de EEA era factible en valores de pH de 5.5 y a 12°C, y que se producía siempre que había crecimiento, mientras que la de EEB se afectaba por la actividad de agua. El crecimiento no era posible a 12°C con una actividad de agua de 0.96 si el pH era inferior a 4.9.

En los dos capítulos anteriores ya se discutió la elección de los medios de cultivo. El medio de Baird-Parker ha sido descrito por varios autores como óptimo para la recuperación de estafilococos a partir de los alimentos, donde presumiblemente habrían experimentado condiciones estresantes

(ver Capítulo II, apartado C.). Para el alimento objeto de la presente discusión, la leche condensada, hemos utilizado el medio de agar sangre en vez del de recuento, PCA, con la finalidad de comprobar rutinariamente la estabilidad de las hemolisinas.

De igual forma, en el capítulo II se discutió y justificó el uso de logaritmos y la necesidad de realizar operaciones matemáticas con ellos, tal y como si se trataran de guarismos de uso común, aún a sabiendas del error matemático que se incluye.

Las cualidades físico químicas de las mayonesas al finalizar el periodo de incubación permanecían invariables con respecto a las iniciales, no apreciándose en absoluto de forma macroscópica ninguna alteración en las muestras.

C.1. EFECTO DEL AZÚCAR

Procedimos a diluir las muestras de mayonesa con un jarabe en el que la concentración de sacarosa era del 62.5% (casi a saturación) con el fin de alterar lo mínimo las características de actividad de agua del producto, no influyendo sobre este parámetro que consideramos básico en las cualidades conservantes de la leche condensada. Preferimos utilizar azúcar comercial a sacarosa de grado reactivo ya que consideramos que es el producto que utilizan

de forma industrial. Al diluir las muestras con este jarabe mejoramos la dispersabilidad de los microorganismos, la manejabilidad del producto para las tomas diarias de muestra para verificar los recuentos, y aun conscientes de que actuabamos sobre la actividad de agua, intentamos que las variaciones de este parámetro fueran mínimas.

WOODBURN et al. (1978) indicaron que el azúcar disminuía el pH tras 12 y 24 horas, pero que la producción de enterotoxinas no variaba con la adición de azúcares. Nuestros resultados coinciden con los de estos autores ya que en estudios comparativos que se realizaron con muestras de leche condensada diluidas y no diluidas, se detectó el mismo número de muestras con presencia de enterotoxinas (tres de cuatro), aunque los valores de recuento no guardaron una correlación muy proxima entre sí. Los autores anteriormente citados habían indicado que se registraba mayor número de colonias en aquellos casos en los que se había adicionado azúcar, lo que coincide plenamente con nuestros resultados. Sin embargo WOODBURN et al. (1978) también hacen mención que en dispersiones coloidales, obtenidas con almidón de maiz y con pasta de almidón, en las que presumiblemente la actividad de agua sería bastante baja, se detectaron menor número de muestras en las que se evidenciara la presencia de enterotoxinas A y C, pero sin embargo fueron anteriores.

CHORDASH y POTTER (1982) estimaron que no hay diferencias en cuanto a la síntesis de enterotoxinas se refiere con la

adición de ningún azúcar reductor a ninguna concentración, pH, temperatura o tiempo. Dichos autores estudiaron la adición de xilosa, lactosa, glucosa, maltosa y fructosa a pH 7.4 y 8.1. Igualmente, indicaron que con la adición de los conservantes propionato sódico y benzoato sódico no había disminución de EEA.

Estos mismos investigadores (CHORDASH y POTTER, 1976) señalaron la posibilidad de adsorción física de la toxina a células bacterianas, por lo que las enterotoxinas podrían permanecer en el sedimento con las células, en vez de en el sobrenadante, en el proceso de extracción de las enterotoxinas para su análisis. También mencionaron el efecto de ciertos metabolitos en la reacción antígeno-anticuerpo, aduciendo los azúcares una especial importancia en este enmascaramiento de las toxinas. Por lo tanto, aun no siendo detectables las enterotoxinas por los métodos serológicos actualmente en uso, podrían producir el síndrome de intoxicación en sujetos sensibles por hallarse presentes en el alimento.

C.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Una característica importante en la tecnología de la leche condensada es que se permite el almacenamiento del producto por espacio de varios meses, bien en locales o en el propio comercio. Este almacenamiento tan a largo plazo a temperatura

ambiente permite que en ocasiones pueda alcanzarse temperaturas superiores a 20°C, lo que ocurriría en verano en naves aisladas, o en invierno en los establecimientos comerciales.

Se dijo anteriormente que la temperatura de crecimiento de los estafilococos se estimaba en el rango de 6.7 a 45.5°C (ANGELOTTI et al., 1961), aunque en opinión de SCHEUSNER et al. (1973) la síntesis de enterotoxinas se produjera entre 19 y 39°C en cortos espacios de tiempo, y IBRAHIM y BALDOCK (1981) estimaran que existen muchas diferencias en cuanto a las distintas cepas. Nuestros resultados indican que en leche condensada sólo 2 de 18 muestras (las dos inoculadas con la cepa 161) incubadas a 22°C fueron positivas a la presencia de enterotoxina detectada por el método del microporta. A 28°C fueron 4 de 16 las muestras positivas, mientras que a 37°C, 7 de 16.

El mayor número de muestras positivas lo registramos cuando la temperatura de incubación fue de 42°C. Esta discrepancia con los datos mencionados pudiera responder a que a temperaturas superiores la leche condensa es mucho más fluida, con lo que la distribución de los microorganismos es más homogénea, impidiéndose una concentración excesiva en un punto en concreto. De igual forma, y ya que la actividad de agua es función de la temperatura, a temperaturas más elevadas este parametro sería superior, por lo que dejaría de ser inhibitorio para el crecimiento de los estafilococos y la

síntesis de enterotoxinas.

No obstante, nuestros resultados nos permiten concluir que aunque a 22°C las posibilidades de síntesis de enterotoxinas serían escasas, podrían sintetizarse niveles peligrosos de enterotoxinas (el límite de detección de la técnica empleada por nosotros es de 0.1 µg/ml) por cepas muy productoras.

C.3. EFECTO DEL INOCULO

Nuestros resultados coinciden con los de FUNG (1972) quien mencionó que independientemente del volumen del inóculo (10^3 a 10^7) el crecimiento y la síntesis de enterotoxina estafilocócica adquiría proporciones similares. Tras 7 días de incubación la media del logaritmo de UFC/g de producto fue de 5.24 (1.8×10^5) cuando el inóculo fue de 1×10^3 , mientras que cuando la concentración de estafilococos de la misma cepa (379) incorporados a la leche condensada fue de 5×10^4 este valor fue de 5.27. Esto pone de manifiesto la escasa influencia que ejerce la concentración del inóculo sobre el desarrollo ulterior de los microorganismos en leche condensada, y aunque no hemos realizado estudios acerca del número mínimo de individuos que proliferarían en este producto, dando lugar a cifras peligrosas por la posibilidad de síntesis de enterotoxinas, se hace evidente la importancia que posee el que el producto acabado carezca absolutamente de microorganismos de este género.

C.4. EFECTO DE LA MARCA DE LECHE CONDENSADA EMPLEADA

Pese al supuesto inicial de que el estudio de las distintas marcas pondría de manifiesto ciertas diferencias en la composición cuantitativa del producto que podría ejercer cierta influencia sobre el desarrollo ulterior de los estafilococos, los datos indican que excepto en la cepa 100, que incubada en las muestras de leche condensada marca B tanto a 28 como a 37 °C por espacio de 7 días no mostró crecimiento alguno, mientras que este si que había sido posible en las otras tres marcas estudiadas, en las demás cepas no se apreciaron diferencias o estas fueron escasas (figura RL32, tablas RL3 y RL4). Desconocemos cual es la razón de que la mencionada cepa 100 fuera inhibida de forma tan drástica en la leche condensada de marca B.

CAPITULO V:

CONCLUSIONES Y RESUMEN

CONCLUSIONES

PRIMERA

En la elaboración del queso tipo Manchego concurren los factores tecnológicos necesarios para que tenga lugar el desarrollo de los estafilococos y la síntesis de enterotoxinas estafilocócicas.

En consecuencia y en atención a los resultados obtenidos, se considera que el queso tipo Manchego es un excelente sustrato para la formación y síntesis de este tipo de toxinas, poniendo de manifiesto un alto riesgo para el consumidor y el interés sanitario consiguiente.

SEGUNDA

Aun cuando los estafilococos pudieran haber declinado, al final del periodo de maduración del queso, la concentración de enterotoxinas no sigue necesariamente una evolución paralela. Por tanto, en los casos en que se sospeche de una intoxicación por enterotoxinas estafilocócicas vehiculadas por queso tipo Manchego, y a fin de lograr el máximo rigor científico, se recomienda la investigación cuantitativa de las propias enterotoxinas con preferencia a la del microorganismo productor, que podría hallarse ausente.

TERCERA

De los resultados obtenidos en el presente estudio se infiere que la enterotoxina tipo A es la que se sintetiza con mayor frecuencia en esta variedad de queso, seguida de la del tipo D. En ningún caso se ha podido detectar la presencia de enterotoxina B, aun con valores de recuento elevados.

CUARTA

En el caso particular de la estirpe S6, reconocida como productora de niveles elevados de enterotoxina de tipo B y de cantidades traza de la de tipo A, no se detectó la presencia de la primera enterotoxina, aunque la mencionada en segundo lugar se evidenciará en concentraciones apreciables.

QUINTA

La concentración por gramo de producto ya madurado (227 ng/100 g) se estima como suficiente para originar casos de intoxicación humana en individuos susceptibles.

SEXTA

En mayonesas no industriales el valor limitante de pH del desarrollo microbiano se ha establecido en 5.0. En un rango inferior, si bien es posible el crecimiento y la multiplicación de estafilococos, parece inverosímil que éstos alcancen cifras peligrosas o que sintetizen enterotoxinas. Por el contrario, a valores superiores este factor pierde su carácter inhibitorio, siendo posible la producción de toxinas en niveles detectables.

SEPTIMA

A la vista de los datos obtenidos en el estudio de las muestras de mayonesa, la temperatura de 22°C se manifestó como aquella que permite el desarrollo óptimo de los estafilococos. Sin embargo, la síntesis de enterotoxinas parece tener lugar de forma más notoria a 28°C, no influyendo el origen del aceite (girasol u oliva) en los resultados.

OCTAVA

Aun no habiéndose determinado el periodo de tiempo mínimo necesario para que la síntesis de enterotoxinas alcance niveles mensurables, se desprende que veinticuatro horas resultan insuficientes, mientras que después de cuatro días de incubación la concentración registrada alcanza valores elevados.

NOVENA

Independientemente de la marca comercial, la leche condensada parece ser un sustrato adecuado, aunque no óptimo, para la síntesis de enterotoxinas estafilocócicas.

DECIMA

La concentración baja del inóculo de estafilococos (1000 UFC/g) en leche condensada no impide que transcurridos tres días la cifra de recuento haya alcanzado niveles peligrosos por la potencialidad de sintetizar enterotoxinas. Dado que este derivado lácteo se almacena a temperatura ambiente por largos periodos de tiempo, es importante la ausencia absoluta de S.aureus en el producto terminado.

DECIMOPRIMERA

La temperatura mínima de incubación a la que se detectó enterotoxina en leche condensada fue de 28°C. Pese a que a 22°C se observó un crecimiento abundante en la mayoría de las muestras sólo se pudo evidenciar la presencia de enterotoxinas en 12.5% de las mismas en un periodo de 7 días.

DECIMOSEGUNDA

a) La actividad DNAsa termoestable se correlacionó satisfactoriamente con el crecimiento microbiano en las muestras de leche condensada. En dichas muestras no se observó, sin embargo, correlación entre dicha actividad y la formación de enterotoxinas de origen estafilócico.

b) En las muestras de mayonesa o en los quesos de tipo Manchego no pudo apreciarse, en cambio, relación alguna entre la actividad DNAsa y cualquier otra de origen celular.

RESUMEN

En el presente estudio se han elegido tres productos como paradigma de alimentos conservables gracias a imposiciones tecnológicas de tres tipos, con el fin de analizar bajo que condiciones se produce la multiplicación de los estafilococos y la síntesis de enterotoxinas (detectadas por las técnicas del "microporta" y de ELISA) por las mismas. Estos alimentos han sido: 1) Queso tipo manchego, modelo de alimento en el que la flora microbiana patógena se inhibe por la adición de un cultivo láctico adecuado; 2) Mayonesa, en la que el control microbiano se ejerce por el ajuste de pH a valores bajos; 3) leche condensada, prototipo de producto en el que la inhibición deriva de una baja actividad de agua. Para dicha elección se ha valorado también la frecuente incriminación de estos productos como causa de intoxicación alimentaria en nuestro país.

Los quesos de tipo manchego fueron elaborados en el Departamento, siguiendo la tecnología clásica, a partir de leche contaminada con las siguientes cepas de estafilococos: 100 (EEA), 56 (EEB y EEA), 107 (EED1), 361 (EED2) y 470 (EED). En otro lote se incorporó enterotoxina (1.7 mg/20 L de leche) en vez de estafilococos. Se incluyeron dos variantes en la concentración del cultivo láctico: 0.1 y 1%.

Las muestras de mayonesa se elaboraron igualmente en el propio Departamento según la receta casera, preparando un lote con aceite de oliva y otro con aceite de girasol. Se inocularon con las cepas S6 (EEB y EEA), 100 (EEA), 137 (EEC1), 326 (EEE), 350 (EEB), 379 (EEB), 472 (EED), 913 (EEA y EEC3), 1143 (EEC1), 1173 (EEB) y 1183 (EEC3). Las muestras de leche condensada siempre tuvieron una procedencia industrial y, distribuidas en alícuotas adecuadas, fueron contaminadas con las estirpes S6 (EEB y EEA), 100 (EEA), 137 (EEC1), 161 (EEA), 196E (EEA), 326 (EEE), 379 (EEB) y 472 (EED). En estos dos últimos alimentos se estudiaron los siguientes parámetros: temperatura (22, 28, 37 y 42 o 44 °C) y tiempo (4, 7, 11 y 14 días) de incubación y concentración del inóculo (10^3 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 y 5×10^6 UFC/g). En la leche condensada se realizaron además estudios comparativos con cuatro marcas diferentes.

Los resultados obtenidos indican que los tres tipos de alimentos son susceptibles de contaminación masiva por estafilococos, pudiendo alcanzar dichos microorganismos concentraciones tales en las que la síntesis de enterotoxinas estafilocócicas sería detectable y podría provocar intoxicación en individuos susceptibles.

La cinética de las células estafilocócicas durante el periodo de afinado en los quesos de tipo manchego incluye la fase logarítmica, la estacionaria y la de declinación. Por este

motivo, no es infrecuente que tras los dos meses de maduración no se registren estafilococos, aunque pudieran haber estado presentes, y permanezcan las enterotoxinas. De éstas, las que hemos observado en mayor concentración ha sido la de tipo A, seguida de la de tipo D, no habiendo detectado las de tipo B ni C en ningún momento. Aunque la concentración de EEA ha sido elevada, no se ha podido detectar enterotoxina B sintetizada por la estirpe S6, considerada como biproductora aunque generalmente sintetice cantidades muy superiores de EEB que de EEA.

En mayonesas se ha evidenciado una diferencia muy significativa entre aquellas preparadas con un pH inferior a 5.0 y aquellas cuyo pH se ajustó sobre este valor. En el primer grupo, las cifras de recuento fueron siempre inferiores a 10 UFC/g en las preparadas con aceite de oliva y a 25.000 UFC/g en las preparadas con aceite de girasol. Excepto en este caso, se ha considerado que la diferencia entre las preparadas con uno y otro tipo de aceite no es significativa. En el segundo grupo se alcanzaron valores elevados de recuento, que justifican la presencia de enterotoxinas en los niveles observados.

De las cuatro temperaturas estudiadas 22°C se ha erigido como óptima para el crecimiento en las muestras de mayonesa: parece ser que la multiplicación es menos notable a medida que se incrementa la temperatura de incubación, y aunque siempre se obtuvieron valores superiores en las mayonesas

preparadas con el aceite de oliva para cada temperatura, la diferencia no fue significativa. La síntesis de enterotoxinas se produce, por el contrario, de forma óptima a 28°C. A cualquier temperatura, no se detectaron enterotoxinas presentes en ninguna muestra incubada por espacio de un día, pero sí así después de 4 días, siendo las cantidades observadas muy elevadas en muchos casos.

En leche condensada incubada a 22°C se demostró la presencia de enterotoxina en sólo las dos muestras inoculadas con la cepa 161, la temperatura óptima de producción, con el mayor número de muestras positivas, se estableció en 42°C. En las temperaturas intermedias estudiadas (28 y 37°C) se observaron un número creciente de muestras positivas a medida que incrementa la temperatura. Al igual que en la mayonesa, no parece probable la síntesis de enterotoxinas en periodos breves de tiempo, pero dada las posibilidades de supervivencia y multiplicación de inóculos pobres (1000 UFC/g) pudiendo desarrollarse 7 u 8 generaciones en tres días, y la característica de conservabilidad a largo plazo de este producto, hace de la leche condensada un producto de riesgo.

La actividad DNAsa termoestable no se correlacionó con el crecimiento estafilocócico en los quesos de tipo manchego o en las muestras de mayonesa. En las muestras de leche condensada guardó cierta relación con el crecimiento, aunque no así con la síntesis de enterotoxinas.

SUMMARY

We have chosen three products as model of preservable foods by three corresponding technological impositions, in order to analyze staphylococcal multiplication and enterotoxin synthesis conditions. These foods have been 1) Manchego type cheese, example of food where pathogenic microflora is inhibited by the addition of an adequate lactic culture; 2) mayonnaise, in which microbiological control is exerted by low pH; 3) sweetened condensed milk, representative of a product where inhibition is accomplished by low water activity. The frequent incrimination of these products in food-borne diseases in Spain has also been considered for the election of these products.

Manchego type cheeses were elaborated in the Laboratory, following the classical technology, with milk contaminated with the following staphylococcal strains: 100 (SEA), S6 (SEB and SEA), 137 (SEC1), 361 (SEC2) and 472 (SED). In other lot, crude enterotoxin was added (1.7 mg SEA and SEB/20 L) instead of staphylococci. Both 0.1 and 1% lactic starter culture were tested.

Mayonnaise samples were equally elaborated in this Laboratory following a home recipe, preparing lots with both olive and sunflower seed oils. Strains S6, 100, 137, 326 (SEE), 350 (SEB), 379 (SEB), 472, 913 (SEA and SEC3), 1143 (SEC1), 1173

(SEB) and 1183 (SEC3) were inoculated. Sweetened condensed milk samples had always a commercial origin, and, allotted conveniently, were contaminated with strains S6, 100, 137, 161 (SEA), 196E (SEA), 326, 379 and 472. In the two last foods the following parameters were studied: incubation temperature (22, 28, 37 and 42 or 44 C) and time (4, 7, 11 and 14 days) and inoculum (10^3 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^6 , 10^6 , 5×10^6 CFU/g). Lastly, four different brands of sweetened condensed milk were compared.

The results show that staphylococci may massively contaminate all three types of food, reaching levels in which enterotoxin synthesis would be detectable and could cause staphylococcal food poisoning in susceptible individuals.

Staphylococcal kinetics during Manchego type cheese ripening includes the logarithmic, stationary and declination stages. Thus, it is possible not to detect staphylococci after two months ripening, though they may have been present and able to synthesize enterotoxins which remain. Of these, the most frequently detected and at higher concentration has been enterotoxin A, followed by SED, not detecting SEB or SEC ever. Though SEA concentration produced by strain S6 has been high, SEB was not detected: this strain is considered as high SEB producer, but poor SEA producer.

In mayonnaise, a significant difference between those prepared with pH under and above 5.0 has been observed. In

the first group, CFU/g were always very low, specially the samples prepared with olive oil (10 CFU/g) but also with sunflower seed oil (25.000 CFU/g). This has been the only case in which the difference between mayonnaises prepared with the two types of oil has been statistically significant. Counts were high in the samples with pH over 5.0, justifying the presence of enterotoxin in the detected levels.

Growth has been optimum at 22 C in mayonnaise; it seems that multiplication is less marked as incubation temperature rises, and although average values were always higher in samples prepared with olive oil at each temperature, differences were not significative. Enterotoxin synthesis takes place optimally at 28 C. No enterotoxin was detected in samples incubated for one day, but it was after 4 days, the concentration being very high in some cases.

In sweetened condensed milk incubated at 22 C enterotoxin was detected in only two samples inoculated with strain 161; optimal enterotoxin production was shown to take place optimally at 42 C. In the intermediate temperature range studied (28 and 37 C) an increasing number of positive samples as temperature rised was observed. As in mayonnaise, enterotoxin synthesis does not seem feasible in short time, but due to the survival and multiplication possibilities of poor inocula (1000 CFU/g) and the characteristic of long term preservation of sweetened condensed milk, even poor inocula (1000 CFU/g) should be considered risky.

DNAse activity did not correlate with staphylococcal growth in Manchego type cheeses or in mayonnaise samples. In sweetened condensed milk samples certain relationship with growth but not with enterotoxin formation was seen.

RESUME

Dans le présent travail, trois produits ont été étudiés comme exemple d'aliments conservables grâce à trois méthodes différentes afin d'analyser les conditions auxquelles les staphylocoques se multiplient et produisent des entérotoxines (détectées au moyen des techniques de "microporte-objets" et de ELISA). Les aliments sont les suivants: 1) Fromage type "manchego", modèle d'aliment dans lequel la flore microbienne pathogène est inhibée par une culture lactique; 2) Mayonnaise, dans laquelle le contrôle microbien est exercé par les conditions de pH acide; 3) lait condensé, prototype de produit conservé grâce à une faible activité-eau. D'autre part, ces produits ont été souvent incriminés comme l'origine d'intoxications alimentaires, raison qui a conditionné le choix de ces produits.

Les fromages type "manchego" furent fabriqués dans le Département, suivant la technologie classique, à partir de lait contaminé avec les suivantes souches de Staphylocoques: 100 (SEA), 50 (SEB et SEA), 137 (SEC1), 361 (SEC2) et 472 (SED). Dans un autre lot on incorpora entérotoxine (1.7 mgr/20 litres de lait) au lieu de staphylocoques. Les cultures lactiques furent utilisées à 2 concentrations: 0.1 et 1%. Les échantillons de mayonnaise furent élaborés aussi dans le Département selon la recette utilisée habituellement, en préparant un lot avec de l'huile d'olive et un autre avec

de l'huile de tournesol. Il furent inoculés avec les souches S6, 100, 137, 326 (SEE), 350 (SEB), 379 (SEB), 472, 914 (SEA et SEC3), 1143 (SEC1), 1173 (SEB) et 1183 (SEC3). Les échantillons de lait condensé, par contre, avaient une origine industrielle, et, une fois distribués en quantités adéquates, ils furent contaminés avec les souches S6, 100, 137, 161 (SEA), 196E (SEA), 326, 379 et 472.

Dans ces deux derniers aliments, on étudia les suivants paramètres: température (22, 28, 37, 42 ou 44°C), période d'incubation (4, 7, 11, 14 jours), et concentration de l'inoculum (10^3 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6). Dans le lait condensé des études comparatives sur trois marques commerciales différentes furent réalisées en plus.

Les résultats obtenus indiquent que les trois types d'aliments sont susceptibles d'une contamination massive par staphylocoques, pouvant ces microorganismes atteindre de telles concentrations que la synthèse d'entérotoxines à staphylocoques pourrait être détectée, et pourrait provoquer une intoxication chez les individus sensibles.

La progression du développement des staphylocoques pendant la maturation des fromages type "manchego" comprend une phase logarithmique, une phase stationnaire et une phase de déclin. Pour cette raison, après les deux mois de maturation les staphylocoques peuvent ne pas être détectés, aient été présents et aient produit des entérotoxines. L'entérotoxine

type A, suivie du type D, ont atteint les plus hautes concentrations, tandis que ni le type B ni le type C ont pu être détectées. Bien que la concentration de SEA ait été élevée, l'entérotoxine synthétisée par la souche S6, considérée comme biproductrice, quoiqu'elle produise généralement des quantités plus élevées de SEB que de SEA, n'a pas pu être mise en évidence.

Dans les mayonnaises, on a mis en évidence une différence très significative entre celles préparées avec un pH inférieur à 5.0 et celles dont le pH fut ajusté à une valeur supérieure. Dans le premier groupe, les dénombrements furent toujours inférieurs à 10 u.f.c./gr dans les mayonnaises préparées avec de l'huile d'olive et à 25.000 u.f.c./gr dans celles préparées avec de l'huile de tournesol. Sauf dans, ce dernier cas la différence basée sur l'emploi d'un genre d'huile ou d'un autre n'a pas été considérée significative. Dans le second groupe, on obtint des dénombrements élevés que justifient la présence d'entérotoxine aux niveaux observés.

Des 4 températures étudiées, 22°C a été choisie comme température optimale pour le développement des microorganismes dans les échantillons de mayonnaise: il semble que à mesure que la température d'incubation augmente, la multiplication devient moins évidente, et bien que les valeurs obtenues furent toujours supérieures dans les mayonnaises préparées avec d'huile d'olive pour chaque température, ces différences ne furent pas significatives.

Par contre, la synthèse d'entérotoxine se réalise de façon optimale à 28 °C. Les entérotoxines ne furent détectées dans aucun échantillon incubé pendant un jour, mais oui au bout de 4 jours d'incubation, et les quantités observées furent dans certains cas très élevées.

La présence d'entérotoxine n'a pu être démontrée que dans deux échantillons de lait condensé contaminés incubés à 22°C (inoculés avec la souche 161). La température optimale de production d'entérotoxine, à laquelle le plus grand nombre d'échantillons fut positif, fut établie à 42°C. En ce qui concerne les autres températures étudiées (28 et 37°C), une augmentation des échantillons positifs fut observée à mesure que la température était plus élevée. De même que pour la mayonnaise, il semble peu probable que la synthèse d'entérotoxine puisse se produire au cours de courtes périodes de temps; mais, étant donné les possibilités de survie et de multiplication observées chez les faibles inocula (1000 u.f.c./gr), pouvant se développer 7 à 8 générations en trois jours, la capacité de conservation à long terme du lait condensé fait de celui-ci un produit dangereux.

Aucune corrélation n'a été observée entre l'activité DNase thermostable et le développement des staphylocoques dans les fromages type manchego, ni dans les échantillons de mayonnaise. Dans les échantillons de lait condensé elle montre une certaine relation avec le développement, mais non

-458-

avec la synthèse d'entérotoxines.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido a que este trabajo fuera una realidad.

De entre ellos quiero significar mi agradecimiento:

Al profesor Dr. Guillermo Suárez Fernández, quien me inició en la Microbiología, brindándome en todo momento su apoyo y confianza.

Al profesor Merlin S. Bergdoll, por todo aquello que me enseñó y sugirió, ofreciéndome su ayuda siempre y en especial durante mi año de estancia en el Food Research Institute (Madison, Wisconsin).

Al profesor Dr. Lucas Domínguez Rodríguez, ejemplo de profesionalidad, dedicación, desinterés y trabajo, por su inestimable colaboración.

Al personal del Food Research Institute, Mary Evenson, Amy Lee, Ruth Robbins, Raoul Reiser, Barbara Crass y Nancy Thompson, sin cuyas enseñanzas no hubiera podido utilizar la técnica del enzimo inmuno ensayo.

Al profesor Dr. Elías Fernando Rodríguez Ferri, en quien

-460-

siempre he encontrado un guía en la oscuridad de mis reflexiones.

A la Central Quesera, S.A. y especialmente a dos de sus directivos, D. Juan Lizarralde y D. Juan Rosique, quienes me facilitaron todo lo necesario para la elaboración de quesos, brindándome tanto su ayuda material como su experiencia en el tema.

A mi madre, Dña Esperanza Duato Rodríguez, artífice de la parte gráfica del presente trabajo.

A mi compañero José Luis Blanco Cancelo, de cuya bondad y buena disposición sé que he abusado y quien, además de ayudar de forma constante en el desarrollo del trabajo con sugerencias y cooperación en la parte experimental, ha colaborado muy especialmente en la elaboración de las tablas.

A los alumnos internos D. Jesús Almazán, D. Luis Miguel Fuentes y D. José Antonio García Cabrera, porque sacrificaron muchas de sus horas libres a fin de ayudarme en el trabajo de laboratorio.

A todos mis compañeros, de quienes aprendí tanto, aunque sólo parte de lo que me intentaron transmitir: Dr. Santiago Vacillo, ejemplo de tenacidad; Dr. Ricardo de la Fuente, ejemplo de honestidad profesional; Dr. José Francisco Fernández Garayzabal, ejemplo de alegría en el trabajo; Dra.

-461-

María Jesús Payá, ejemplo de constancia; Dra. Ana Mateos, ejemplo de trabajo metódico; Dra. Teresa Cutuli, ejemplo de humanidad y comprensión; Dr. Miguel Angel Moreno, ejemplo de capacidad de trabajo, Dña. Carmen Ramos, ejemplo de carácter animoso; D. José Antonio Vázquez, ejemplo de metodología científica. Así mismo, a D. Félix Fernández y a Dña. Pilar Capón, quienes siempre me tuvieron preparado el material a utilizar.

BIBLIOGRAFIA

AHMED, A.A.-H., M.K.MOUSTAFA and E.H.MARTH (1983a) Growth and enterotoxin production by Staphylococcus aureus in whey from the manufacture of Domiati cheese. J.Food Protect., 46:235-237.

AHMED, A.A.-H., M.K.MOUSTAFA and E.H.MARTH (1983b) Growth and survival of Staphylococcus aureus in Egyptian Domiati cheese. J.Food Protect., 46:412-415.

ALLEN, V.D. and W.D.STOVAL (1960) Laboratory aspects of staphylococcal food poisoning from Colby cheese. J.Milk Food Technol., 23:271-274.

ALTENEERN, R.A. (1975) Derivation of high enterotoxin S-producing mutants of Staphylococcus aureus from the parent strains. Appl.Microbiol., 30:271-275.

ANGELOTTI, R. (1969) Staphylococcal intoxications. Citado por NISANEN (1977).

ANGELOTTI, R., M.J.POTER and S.-R.LEWIS (1961) Time-temperature effects on salmonellae and staphylococci in foods. II.Behavior at warm holding temperatures. Am.J.Public Hlth., 51:83-88.

- ARESON, P.D.W., S.E.CHARM and B.L.WONG (1980) Determination of staphylococcal enterotoxins A and B in various food extracts, using staphylococcal cells containing protein A. J.Food Sci., 45:400-401.
- AVENA, R.M. and M.S.BERGDOLL (1967) Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, Staphylococcus aureus strain 361. Biochemistry, 6:1474-1480.
- SAIRD-PARKER, A.C. (1962) An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. J.Appl.Bacteriol., 25:12-19.
- BARBER, L.E. and R.H.DEIBEL (1972) Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage. Appl.Microbiol., 24:891-898.
- BARVE, S.S. and P.R.KULKARNI (1984) Comparative effect of concentration of carbohydrate and salt on detection of thermonuclease and coagulase in pathogenic strains of Staphylococcus aureus. J.Food Protect., 47:102-104.
- BATISH, V.K., H.CHANDER, D.R.GHODEKAR and B.RANGANATHAN (1981) Production of thermonuclease deficient mutants from an enterotoxigenic thermonuclease producing strain of Staphylococcus aureus. J.Food Sci., 46:1252-1254.

BATISH,V.K., H.CHANDER and B.RANGANATHAN (1982)
Characterization of deoxyribonuclease positive
enterococci isolated from milk and milk products. J.Food
Protect., 45:348-353.

BATISH,V.K., H.CHANDER and B.RANGANATHAN (1984) Screening of
milk and milk products for thermonuclease. J.Food Sci.,
49:1196-1197.

SENNETT,R.W. and F.McCLURE (1975) Collaborative study of the
serological identification of staphylococcal enterotoxins by the microslide gel double diffusion test.
J.A.C.C.C., 59:594-601.

SENNETT,R.W. and W.T.AMOB (1980) Staphylococcus aureus growth
and toxin production in nitrogen-packed sandwiches.
J.Food Protect., 43:157-161.

SENNETT,R.W., S.A.PECSEYAN, S.R.TATINI, H.THOTA and
W.S.COLLINS (1973) Staphylococcal enterotoxin.
Comparative study of serological detection methods. II.
Can.Inst.Food Sci.Technol.J., 6:131-134.

BERDAL,B.P., G.OLEVIN and T.OMLAND (1981) A sandwich ELISA
method for detection of Staphylococcus aureus
enterotoxins. Acta pathol. microbiol. Scand.,
89:411-415.

BERGDOLL, M.S. (1970) Enterotoxins. En: T.C. Montie, S. Kadis y S.J. Ajil (eds.) "Microbial Toxins" vol. III. pp. 265-326. Academic Press, New York.

BERGDOLL, M.S. (1972) The nature of bacterial toxins. Clin. Toxicol., 5:441-451.

BERGDOLL, M.S. (1962) Conferencia de entrada en la Academia de Ciencias Veterinarias. Madrid.

BERGDOLL, M.S. (1963) Enterotoxins. En: C.S.F. Easmon y C. Adiam (eds.) "Staphylococci and Staphylococcal Infections" vol. II. pp. 559-598.

BERGDOLL, M.S. and R.F. REISER (1960) Application of radio-immunoassay for detection of staphylococcal enterotoxin in foods. J. Food Protect., 43:68-72.

BERGDOLL, M.S. and R.N. ROBBINS (1973) Characterization of types of staphylococcal enterotoxins. J. Milk Food Technol., 36:610-612.

BERGDOLL, M.S., H. SUGIYAMA and G.M. DACK (1959) Staphylococcal enterotoxin. I. Purification. Arche. Biochem. Biophysics, 85:62-69.

BERGDOLL, M.S., F.S. CHU, I.-Y. HUANG, C. ROWE and T. SHIH (1965)

Staphylococcal enterotoxin B. III. The physicochemical properties and N- and C-terminal amino acid sequences. Arch. Biochem. Biophys., 112:104-110.

BERGDOLL, M.S., I.-Y. HUANG, F.S. CHU and C. BORJA (1969) The chemistry of bacterial toxins: the staphylococcal enterotoxins. J. South African Chem. Inst., 22:99-105.

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA, R.N. ROBBINS and K.F. WEISS (1971) Identification of enterotoxin E. Infect. Immun., 4:593-595.

BERGDOLL, M.S., R.N. ROBBINS, K. WEISS, C.R. BORJA, I.-Y. HUANG and F.S. CHU (1973) The staphylococcal enterotoxins: similarities. Contrib. Microbiol. Immunol., 1:390-396.

BERGDOLL, M.S., J.K. CZOP and S.S. GOULD (1974a) Enterotoxin synthesis by the staphylococci. Ann. N.Y. Acad. Sci., 236:307-316.

BERGDOLL, M.S., I.-Y. HUANG and E.J. SCHANTZ (1974b) Chemistry of the staphylococcal enterotoxins. Agricultural and Food Chem., 22:9-13.

BERGDOLL, M.S., R. REISER and J. SPITZ (1976) Staphylococcal enterotoxins - Detection in food. Food Technol., 80-84.

BERGDOLL, M.S., A.L. NOLETO, R.F. REISER and R.N. ROBBINS (1979)

Citado por BERGDOLL (1983).

BERGDOLL, M.S., B.A. CRASS, R.F. REISER, R.N. ROBBINS and J.P. DAVIES (1981) A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock-syndrome Staphylococcus aureus isolates. The Lancet, ii: 1017-1021.

BERKELEY, R.C.W., E.A. PEPPER, M.P. CAULFIELD and J. MELLING (1978) The inhibition of Staphylococcus aureus enterotoxin A production by cerulenin and quinacrine; presumptive evidence for a lipid intermediate/protease release mechanism. FEMS Microbiol. Lett., 4:103-105.

BERRY, B.W., K.F. LEDDY and C.A. ROTHENBERG (1984) Survival and growth of Staphylococcus aureus on temperature-abused beef livers. J. Food Protect., 47:260-262.

BISSONNETTI, N., R.A. LACHANCE, J. GOULET, M. LANDGRAF and C.E. PARK (1980) Evidence of thermonuclease production by Bacillus spp. and enterotocci in naturally contaminated cheese. Cand. J. Microbiol., 26:722

BLANCO, A., B. MORA, M.G. MOSQUERA, L. RODRIGUEZ y C. TERESA (1984) La estafilococia nasal en manipuladores de alimentos: incidencia en la provincia de Orense 1.981. Resúmenes de la 4 Reunion Científica del Grupo de Microbiología de los Alimentos. Pamplona.

BOLETIN EPIDEMIOLOGICO SEMANAL (1980) Ministerio de Sanidad y
Seguridad Social. Número 1459:361-367.

BOLETIN EPIDEMIOLOGICO SEMANAL (1981) Ministerio de Sanidad y
Seguridad Social. Número 1509: 345-347.

BOLETIN EPIDEMIOLOGICO SEMANAL (1982) Ministerio de Sanidad y
Seguridad Social. Número 1541: 133-137.

BOLETIN EPIDEMIOLOGICO SEMANAL (1983) Ministerio de Sanidad y
Seguridad Social. Número 1612:323-325

BOLETIN EPIDEMIOLOGICO SEMANAL (1983) Ministerio de Sanidad y
Seguridad Social. Número 1619: 377-379.

BOLETIN EPIDEMIOLOGICO SEMANAL (1984) Ministerio de Sanidad y
Seguridad Social. Número 1650:233-234.

BOLETIN EPIDEMIOLOGICO SEMANAL (1984) Ministerio de Sanidad y
Seguridad Social. Número 1668:377-379.

BOLETIN EPIDEMIOLOGICO SEMANAL (1985)
Ministerio de Sanidad y Seguridad Social. Número 1686:
116-118.

BOLETIN EPIDEMIOLOGICO SEMANAL (1985) Ministerio de Sanidad y
Seguridad Social. Número 1687: 124-126.

BORJA, C.R. (1969) Staphylococcal enterotoxin C. I. Phenolic hydroxyl ionization. Biochemistry, 8:71-75.

BORJA, C.R. and M.S. BERGDOLL (1967) Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by Staphylococcus aureus strain 137. Biochemistry, 6:1467-1473.

BORJA, C.R. and M.S. BERGDOLL (1969) Staphylococcal enterotoxin C. II. Some physical, immunological and toxic properties. Biochemistry, 8:75-79.

BORJA, C.R., E. FANNING, I.-Y. HUANG and M.S. BERGDOLL (1972) Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E. J. Biol. Chem., 247: 2456-2463.

BOUWER-HERTZBERGER, S.A. and H.M. SOHL-VOS (1981) False-negative results in examining foods for staphylococcal thermonuclease. Antonie van Leeuwenhoek, 417:245-246.

BOYLAN, S.L., K.A. ACCOTT and T.P. LABUZA (1976) Staphylococcus aureus challenge study in an intermediate moisture food. J. Food Sci., 41:918-921.

BRYAN, F.L. (1970) The epidemiology of Staphylococcal food poisoning. Citado por NISHANEN (1977).

BUKOVIC, J.A. and H.M. JOHNSON (1975) Staphylococcal enterotoxin C: solid-phase radioimmunoassay. Appl. Microbiol., 30:700-701.

BUKOVIC, J.A., H.M. JOHNSON and J.T. PEELER (1975) Comparative inhibitory effects of antigen and antibody in the staphylococcal enterotoxin solid-phase radioimmunoassay system. Appl. Microbiol., 29:765-768.

BUXSER, S. and P.F. BONVENTRE (1981) Staphylococcal enterotoxins fail to disrupt membrane integrity or synthetic functions of Henle 407 intestinal cells. Infect. Immun., 31:929-934.

CARPENTER, D.F. and G.J. SILVERMAN (1974) Staphylococcal enterotoxin B and nuclease production under controlled dissolved oxygen conditions. Appl. Microbiol., 28:628-637.

CASMAN, E.F. (1958) Serologic studies of staphylococcal enterotoxin. J. Bacteriol., 73:599-609.

CASMAN, E.F. (1960) Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. J. Bacteriol., 79:849-856.

CASMAN, E.F. (1965) Staphylococcal enterotoxin. Ann. N. York Acad. Sci., 128:124-131.

CASMAN, E.P. (1967) Staphylococcal food poisoning. Health Lab.Sci., 4:199-206.

CASMAN, E.P. and R.W.BENNETT (1963) Culture medium for the production of staphylococcal enterotoxin A. J.Bacteriol., 86:18-23.

CASMAN, E.P. and R.W.BENNETT (1965) Detection of staphylococcal enterotoxin in food. Appl.Microbiol., 13:181-189.

CASMAN, E.P., M.S.BERGDOL and J.ROBINSON (1963) Designation of staphylococcal enterotoxins. J.Bacteriol., 85:715-716.

CASMAN, E.P., R.W.BENNETT, A.E.DORSEY and J.E.STONE (1969) The micro-slide gel double diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. Health Lab.Sci., 6:185-194.

CLARK, W.G. and H.L.BORINSON (1963) Pyrogenic effect of purified staphylococcal enterotoxin. J.Pharmacol. Exp.Ther., 142:237-241.

CLARK, W.G. and J.S.PAGE (1968) Pyrogenic responses to staphylococcal enterotoxins A and B in cats. J.Bacteriol., 96:1940-1946.

CODIGO ALIMENTARIO ESPANOL (1980) Boletin Oficial del Estado.

COLLINS, W.S., J.F. METZGER and A.D. JOHNSON (1972) A rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal B enterotoxin. J. Immunol., 108:852-856.

COLLINS, W.S., A.D. JOHNSON, J.F. METZGER and R.W. BENNETT (1973) Rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. Appl. Microbiol., 25:774-777.

COLLINS-THOMPSON, D.L., B. ARIS and A. HURST (1973) Growth and enterotoxin B synthesis by S. aureus S-6 in associative growth with Ps. aeruginosa. Can. J. Microbiol., 19:1197-1201.

CORDS, B.R. and S.R. TATINI (1973) Applicability of heat stable deoxyribonuclease assay for assessment of staphylococcal growth and the presence of enterotoxin in cheese. J. Dairy Sci., 56:1512-1519.

CRAWLEY, G.J., J.N. BLACK, I. GRAY and J.W. BLANCHARD (1966) Clinical chemistry of staphylococcal enterotoxin poisoning in monkeys. Appl. Microbiol., 14:445-450.

CZOP, J.K. and M.S. BERGDOLL (1970) Synthesis of enterotoxin L-forms of Staphylococcus aureus. Infect. Immun., 1:169-173.

CHANG,H.-C. and M.S.BERGDOLL (1979) Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D. Biochemistry, 18:1937-1942.

CHANG,H.-C. and H.E.HALL (1963) Resistance of free-living nematodes to staphylococcal enterotoxin. Appl. Microbiol., 11:365-367.

CHOPIN,A., S.TESONE, J.-P.VILA, Y.LE GRAET et G.MOCQUOT (1978) Survie de Staphylococcus aureus au cours de la preparation et de la conservation du lait ecreme en poudre. Problems poses par le denombrements del survivants. Can.J.Microbiol., 24:1371-1380.

CHORDASH,R.A. and N.N.POTTER (1976) Stability of staphylococcal enterotoxin A to selected conditions encountered in foods. J.Food Sci., 41:906-909.

CHRISTIAN,J.H.B. and J.A.WALTHO (1962) The water relation of Staphylococci and Micrococci. J.Appl.Bacteriol., 25: 369-377.

CHU,F.S. (1968) Hydrogen ion equilibria of staphylococcal enterotoxin B. J.Biol.Chem., 243:4342-4349.

CHU,F.S. and M.S.BERGDOLL (1969) Studies on the chemical modification of staphylococcal enterotoxin B. I. Alkylation and oxidation of methionine residues.

Biochim.Biophys.Acta, 194:279-286.

CHU,F.S. and E.CRARY (1969) Studies on the chemical modification of staphylococcal enterotoxin B. II. Carboxyl residues. Biochim.Biophys.Acta, 194:287-292.

CHU,F.S., K.THADNANI, E.J.SCHANTZ and M.S.BERGDOLL (1966) Purification and characterization of staphylococcal enterotoxin A. Biochemistry, 5:3281-3289.

CHU,F.S., E.CRARY and M.S.BERGDOLL (1969) Chemical modification of amino groups in staphylococcal enterotoxin B. Biochemistry, 8:2890-2896.

DAHIYA,R.S. and M.L.SPECK (1968) J.Dairy Sci., 51:1568.
Citado por IBRAHIM (1978).

DALIDOWICZ,J.E., S.J.SILVERMAN, E.J.SCHANTZ, D.STEFANYE and L.SPERO (1966) Chemical and biological properties of reduced and alkylated staphylococcal enterotoxin B. Biochemistry, 5:2375-2381.

DALY,C. (1973) Studies on the inhibition of food-borne pathogens and spoilage bacteria by lactic acid starter cultures. Diss.Abstr.Int. B33:4407-4408.

D'ARCA SIMONETTI,A. (1975) Sulla produzione di enterotossina stafilococcica a temperatura di frigorifero. Nuovi Annali

d'Igiene e Microb., 26:379-396.

DELARRAS, C. and P. LABAN (1981) Distribution of the different Staphylococcus species according to their meat or dairy origin. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt. Orig. B, 173:471-477.

DENNY, C.B., P.L. TAN and C.W. BOHRER (1966) Heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A. J. Food Sci., 31:762-767.

DENNY, C.B., J.Y. HUMBER and W. BOHRER (1971) Effect of toxin concentration on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A in beef bouillon and in phosphate buffer. Appl. Microbiol., 21:1064-1066.

DICKIE, N. and M. AKHTAR (1962) Improved radioimmunoassay of staphylococcal enterotoxin A. J. A. D. A. C., 65:180-184.

DICKIE, N., Y. YANO, C. PARK, H. ROBERN and S. STARVIC (1973) Solid-phase radioimmunoassay of staphylococcal enterotoxins in food. Citado por NISKANEN (1977).

DIETRICH, G.G., R.J. WATSON and G.J. SILVERMAN (1972) Effect of shaking speed on the secretion of enterotoxin B by Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol., 24:561-566.

DiGIACINTO, J.V. and W.C. FRAZIER (1966) Effect of coliform and Proteus bacteria on growth of Staphylococcus aureus.

Appl.Microbiol., 14:124-129.

DONNELLY,C.B., L.A.BLACK and K.H.LEWIS (1964) Occurrence of coagulase-positive staphylococci in cheddar cheese. Appl.Microbiol., 12:311-315.

DONNELLY,C.B., J.E.LESLIE, L.A.BLACK and K.H.LEWIS (1967) Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. Appl.Microbiol., 15:1382-1387.

DONNELLY,C.B., J.E.LESLIE and L.A.BLACK (1968) Production of enterotoxin A in milk. Appl.Microbiol., 16:917-924.

DORNBUSCH,K., H.O.HALLANDER and F.LOFQUIST (1969) Extrachromosomal control of methicillin resistance and toxin production in Staphylococcus aureus. J.Bacteriol., 98:351-358.

DOYLE ET AL. (1982) Fate of Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus in meat salads prepared with mayonnaise. J.Food Protect., 45:152-156.

EMSWILLER-ROSE,B.S., R.W.JOHNSTON, M.E.HARRIS and W.H.LEE (1980) Rapid detection of staphylococcal thermonuclease on casings of naturally contaminated fermented sausages. Appl.Environ.Microbiol., 40:13-18.

ERICKSON,A. and R.H.DEIBEL (1973) Production and heat

stability of staphylococcal nuclease. Appl.Microbiol.,
25:332-336.

FABIAN,F.W. (1947) Am.J.Public Health, 37:987. Citado en el
Boletin de la Federation Internationale de Laiterie
(1980).

FEDERATION INTERNATIONALE DE LAITERIE - INTERNATIONAL DAIRY
FEDERATION (FIL-IDF) (1980) Behaviour of pathogens in
cheese. Document 122: 3-16.

FEY,H. (1982) citado por FEY et al. (1984).

FEY,H, G.STIFFLER-ROSENBERG, G.WARTENWEILER-BURKHARD,
C.MULLER und O.RUEGG (1982) Der Nachweis von
Staphylokokken-Enterotoxinen (SET) Schweiz.Arch.
Tierheilk., 124:297-306.

FEY,H., H.PFISTER and O.RUEGG (1984) Comparative evaluation
of different ELISA systems for the detection of
staphylococcal enterotoxins A, B, C and D.
J.Clin.Microbiol., 19:34-38.

FITZ,F. and J.J.OWENS (1978) Staphylococcus aureus in Cheddar
cheese. Process Biochemistry, 12:

FOOD RESEARCH INSTITUTE ANNUAL REPORT (1982) Madison,
Wisconsin.

FOX, J.B. and D.F. HOLTMAN (1968) Effect of anaerobiosis on staphylococcal nuclease production. J. Bacteriol., 95: 1548-1550.

FREED, R.C., M.L. EVENSON, R.F. REISER and M.S. BERGDOLL (1982) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin in foods. Appl. Environ. Microbiol., 44:1349-1355.

FRIEDMAN, M.E. (1968) Inhibition of staphylococcal enterotoxin B formation by cell wall blocking agents and other compounds. J. Bacteriol., 95:1051-1055.

FRIEDMAN, M.E. and J.D. WHITE (1965) Immunofluorescent demonstration of cell-associated staphylococcal enterotoxin B. J. Bacteriol., 89:1155-1157.

FUNG, D.Y.C. (1972) Experimental production of enterotoxin B in fish protein concentrates. J. Milk Food Technol., 35:577-581.

FUNG, D.Y.C. and A.A. WAGNER (1971) Capillary tube assay for staphylococcal enterotoxins A, B, and C. Appl. Microbiol., 21:559-561.

GANDHI, N.R. and G.H. RICHARDSON (1971) Capillary tube immunological assay for staphylococcal enterotoxins.

Appl.Microbiol., 21:626-627.

GAYA,P., M.MEDINA and M.NUNEZ (1983) Accelerated decrease of Enterobacteriaceae counts during ripening of raw milk Manchego cheese by lactic culture inoculation. J.Food Protect., 46:305-308.

GENIGEORGIS,C. (1974) Recent developments on staphylococcal food poisoning. Citado por NISKANEN (1977).

GENIGEORGIS,C.A. (1981) Factors affecting the probability of growth of pathogenic microorganisms in foods. J.A.V.M.A., 179:1410-1417.

GENIGEORGIS,C. and W.W.SADLER (1966) Characterization of strains of Staphylococcus aureus isolated from livers of commercially slaughtered poultry. Poultry Sci., 45: 973-980.

GENIGEORGIS,C., H.RIEMANN and W.W.SADLER (1969) Production of enterotoxin B in cured meats. J.Food Sci., 34:62-68.

GENIGEORGIS,C., M.S.FODA, A.MANTIS and W.W.SADLER (1971a) Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. Appl.Microbiol., 21:862-866.

GENIGEORGIS,C., S.MARTIN, C.E.FRANTI and H.RIEMANN (1971b) Initiation of staphylococcal growth in laboratory media.

Appl.Microbiol., 21:934-939.

GENIGEORGIS,C., M.SAVOUDIKIS and S.MARTIN (1971c) Initiation of staphylococcal growth in processed meat environments. Appl.Microbiol., 21:940-942.

GEORGE,E., J.C.OLSON, J.S.JEZESKI and S.T.COULTER (1959) The growth of staphylococci in condensed skim-milk. J.Dairy Sci., 42:816-823.

GILBERT,C.F. (1966) Effects of staphylococcal enterotoxin B on the coagulation mechanism and leukocytic response in beagle dogs - A preliminary study. Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica, 16:697-706.

GILBERT,R.J., B.C.HOBBS, G.I.BARROW, W.L.HOOPER, H.G.M.SMITH, M.E.M.THOMAS, A.T.WILLIS and A.E.WRIGHT (1972) A comparative assessment of media for the isolation and enumeration of coagulase positive staphylococci from foods. J.Appl.Bacteriol., 35:673-679.

GILLILAND,S.E. and M.L.SPECK (1969) Appl.Microbiol., 17:797.
Citado en el Boletin de la Federation Internationale de Laiterie (1990).

GILLILAND,S.E. and M.L.SPECK (1972) Interactions of food starter cultures and foodborne pathogens: lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae.

J.Milk Food Technol., 35:307-310.

GILLILAND, S.E. and M.L.SPECK (1974) Appl.Microbiol., 28:1090.
Citado por IBRAHIM (1978).

GOEFFERT, J.M., I.K.ISKANDER and C.H.AMUNDSON (1970) Relation
of the heat resistance of salmonellae to the water
activity of the environment. Appl.Microbiol.,
19:429-438.

GOSH, S.S. and H.LAXMINARAYAMA (1973) Indian J.exp.Biol.,
11:457. Citado en el Boletin de la Federation
Internationale de Laiterie (1980).

GRAY, R.J.H., M.A.GASKE and Z.J.ORDAL (1974) Enumeration of
thermally stressed Staphylococcus aureus MF31. J.Food
Sci., 39:844-846.

GUDDING, R. (1979) The demonstration and characterization of
deoxyribonucleases of streptococci group A, B, C, G and
L. Acta Vet.Scand., 20:102-121.

HAINES, W.C. and L.G.HARMON (1973a) Effect of variations in
conditions of incubation upon inhibition of Staphylo-
coccus aureus by Pediococcus cerevisae and Streptococcus
lactis. Appl.Microbiol., 25:169-172.

HAINES, W.C. and L.G.HARMON (1973b) Effect of selected lactic

acid bacteria on growth of Staphylococcus aureus and production of enterotoxin. Appl.Microbiol., 25:436-441.

HALL, H.E., R.ANGELOTI and K.H.LEWIS (1965) Detection of the staphylococcal enterotoxins in food. Helath Lab.Sci., 2:179-191.

HALLANDER, H.O. (1965) Production of large quantities of enterotoxin B and other staphylococcal toxins on solid media. Acta Pathol.Microbiol.Scand., 63:299-305.

HANSEMAN, J.Y., S.GUILBERT, N.RICHARD et J.C.CHEFTEL (1981) Influence conjointe de l'activite de l'eau et du pH sur la croissance de Staphylococcus aureus dans un aliment carne a humidite intermediaire. Lebens.-Wiss. u.-Technol., 13:269-270.

HARBRECHT, D.F. and M.S.BERGDOLL (1980) Staphylococcal enterotoxin B production in hard-boiled eggs. J.Food Sci., 45:307-309.

HEBERT, G.A., P.L.PELHAM and B.PITTMAN (1973) Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera. Appl.Microbiol., 25:26-36.

HEIDELBAUER, R.J. and P.R.MIDDAUGH (1973) Inhibition of staphylococcal enterotoxin production in convenience foods.

J.Food Sci., 38:885-888.

HENDRICKS, S.L., R.A.BELKNAP and W.J.HAUSLER (1959)
Staphylococcal food intoxication due to Cheddar cheese.
I.Epidemiology. J.Milk Food Technol., 22:313-317.

HILL (1975) Citado por TROLLER (1976)

HODOVAL, L.F., M.I.RAPOPORT and W.R.BEISEL (1966) A radio-
bioassay for staphylococcal enterotoxin B antitoxin.
J.Lab. and Clin.Med., 68:678-685.

HODOVAL, L.F., E.L.MORRIS, D.D.ELSPERY and W.R.BEISEL (1967)
Effect of staphylococcal enterotoxin B on the
electroencephalogram of monkeys. Appl.Microbiol., 15:
403-406.

HODOVAL, L.F., E.L.MORRIS, G.J.CRAWLEY and W.R.BEISEL (1968)
Pathogenesis of lethal shock after intravenous staphy-
lococcal enterotoxin B in monkeys. Appl.Microbiol.,
16:187-192.

HODJVAT, S.A. and H.JACKSON (1969) Effects of sodium chloride
and production of enterotoxin B by Staphylococcus aureus.
Can.Inst.Food Sci.Technol.J., 2:56-59.

HSIEH, F., K.ACOTT, and T.P.LABUZA (1975) The effect of water
activity on the heat resistance of vegetative cells in

the intermediate moisture range. Lebensm.-Wissens. u. Technol., 8:78

HSIEH, F.-H., K. ACOTT and T. P. LABUZA (1976) Death kinetics of pathogens in a pasta product. J. Food Sci., 41:516-519.

HUANG, I.-Y. and M. S. BERGDOLL (1970a) The primary structure of staphylococcal enterotoxin B. I. Isolation, composition and sequence of tryptic peptides from oxidized enterotoxin B. J. Biol. Chem., 245:3493-3510.

HUANG, I.-Y. and M. S. BERGDOLL (1970b) The primary structure of staphylococcal enterotoxin B. II. Isolation, composition and sequence of chymotryptic peptides. J. Biol. Chem., 245:3511-3517.

HUANG, I.-Y. and M. S. BERGDOLL (1970c) The primary structure of staphylococcal enterotoxin B. III. The cyanogen bromide peptides of reduced and aminoethylated enterotoxin B, and the complete amino acid sequence. J. Biol. Chem., 245:3518-3525.

HUMBER, J. Y., C. B. DENNY and W. BOHRER (1975) Influence of pH on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A as determined by monkey feeding and serological assay. Appl. Microbiol., 30:755-758.

HURST, A., A. HUGHES, J. L. BEARE-ROGERS and D. L. COLLINS-THOMPSON

(1973) Physiological studies on the recovery of salt tolerance by Staphylococcus aureus after sublethal heating. J.Bacteriol., 116:901-907.

IANDOLO, J.J. and D.W.DYER (1981) The staphylococcal enterotoxins - A genetic overview. J.Food Safety, 3:249-264.

IANDOLO, J.J. and W.M.SHAFFER (1977) Regulation of staphylococcal enterotoxin B. Infect.Immun., 16:610-616.

IANDOLO, J.J., C.W.CLARK, L.BLUHM and Z.J.ORDAL (1965) Repression of Staphylococcus aureus in associative culture. Appl.Microbiol., 13:646-649.

IBRAHIM, G.F. (1978) Inhibition of Staphylococcus aureus under simulated cheddar cheese-making conditions. Austr. J.Dairy Technol., 33:102-108.

IBRAHIM, G.F. (1981) A simple sensitive method for determining staphylococcal thermonuclease in cheese. J.Appl. Bacteriol., 51:307-312.

IBRAHIM, G.F. and A.K.BALDOCK (1981) Thermostable deoxyribonuclease content and enterotoxigenicity of cheddar cheese made with sub-normal starter activity. J.Food Protect., 44:655-660.

IBRAHIM,G.F., H.M.RADFORD and L.R.FELL (1980) Determination of staphylococcal enterotoxin A in cheddar cheese produced without starter activity. Appl.Environ. Microbiol., 39:1134-1137.

IBRAHIM,G.F., D.R.BALDOCK, A.K.BALDOCK and L.B.IRELAND (1981a) Inhibition of growth of Staphylococcus aureus and enterotoxin-A production in cheddar cheese produced with induced starter failure. J.Food Protect., 44: 189-193.

IBRAHIM,G.F., A.K.BALDOCK, D.R.RADFORD and L.B.IRELAND (1981b) Inhibition of Staphylococcus aureus growth and enterotoxin-A production in cheddar cheese produced with variable starter activity. J.Food Protect., 44:263-267.

INGRAM,M. (1962) Microbiological principles in prepacking meats. J.Appl.Bacteriol., 25:259-281.

JAMLANG,E.M., M.L.BARTLETT and H.E.SNYDER (1971) Effect of pH, protein concentration and ionic strength on heat inactivation of staphylococcal enterotoxin B. Appl.Microbiol., 22:1034-1040.

JARVIS,A.W. and R.C.LAWRENCE (1970) Production of high titers of enterotoxins for the routine testing of staphylococci. Appl.Microbiol., 19:696-699.

JARVIS, A.W., R.C. LAWRENCE and G.G. PRITCHARD (1973) Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C under conditions of controlled pH and aeration. *Infect. Immun.*, 7:847-854.

JARVIS ET AL. (1975) Glucose repression of enterotoxins A, B, and C and other extracellular proteins in staphylococci in batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, 85:75-87.

JEZESKI, J.J., H.A. MORRIS, E.A. ZOTTOLA, E. GEORGE and F.F. BUSTA (1961) The effect of penicillin in milk on the growth and survival of Staphylococcus aureus during the manufacture and curing of cheddar and colby cheese. *J. Dairy Sci.*, 44:1160.

JEZESKI, J.J., S.R. TATINI, P.C. DeGARCIA and J.C. OLSON (1967) Influence of Streptococcus lactis on growth and enterotoxin A production by Staphylococcus aureus in milk. *Bacteriol. Proceed.*, 12.

JOHNSON, H.M., H.E. HALL and M. SIMONS (1967) Enterotoxin B: serological assay in cultures by passive hemagglutination. *Appl. Microbiol.*, 15:815-818.

JOHNSON, H.M., J.A. BUKOVIC, P.E. KAUFFMAN and J.T. FEELER (1971) Staphylococcal enterotoxin B: solid-phase radioimmunoassay. *Appl. Microbiol.*, 22:837-841.

- JOHNSON, H.M., J.A. BUKOVIC and P.E. KAUFFMAN (1973) Staphylococcal enterotoxins A and B: solid-phase radioimmunoassay in food. *Appl. Microbiol.*, 26:309-313.
- JUOKSLAHTI, T., A. NISKANEN, S. LINDROTH and T. PEKKANEN (1980) Experimental staphyloenterotoxigenosis in mink. *Acta Vet. Scand.*, 21:336-346.
- KAO, C.T. and W.C. FRAZIER (1966) Effect of lactic acid bacteria on growth of Staphylococcus aureus. *Appl. Microbiol.*, 14:251-255.
- KAPLAN, M.H. and M.J. TENENBAUM (1982) Staphylococcus aureus: cellular biology and clinical application. *Am. J. Med.*, 72:248-257.
- KATO, E., M. KHAN, L. KUJOVICH and M.S. BERGDOLL (1966) Production of enterotoxin A. *Appl. Microbiol.*, 14:966-972.
- KAUFFMAN, P.E. (1980) Enzyme immunoassay for staphylococcal enterotoxin A. *J. A. O. A. C.*, 63:1138-1143.
- KAUFFMAN, P.E. and H.M. JOHNSON (1975) Stability of 125-I labeled staphylococcal enterotoxins in solid-phase radioimmunoassay. *Appl. Microbiol.*, 29:776-779.

KELLER,G.M., R.S.HANSON and M.S.BERGDOLL (1978a) Molar growth yields and enterotoxin B production of Staphylococcus aureus S-6 with amino acids as energy sources. Infect.Immun., 20:151-157.

KELLER,G.M., R.S.HANSON and M.S.BERGDOLL (1978b) Effect of minerals on staphylococcal enterotoxin B production. Infect.Immun., 20:158-160.

KENT,T.H. (1966) Staphylococcal enterotoxin gastroenteritis in rhesus monkeys. Am.J.Pathol., 48:387-407.

KHALID,A.S. and W.F.HARRIGAN (1984) A study of the effects of bacterial competitors, sodium chloride and medium on growth of a toxin-producing Staphylococcus aureus strain. Lebensm.-Wiss. u. Technol., 17:137-141.

KOENIG,S. and E.H.MARTH (1982) Behavior of Staphylococcus aureus in cheddar cheese made with sodium chloride or a mixture of sodium chloride and potassium chloride. J.Food Protect., 45:996-1002.

KOPER,J.W., HAGENAARS,A.M. and NOTERMANS,S. (1980) Prevention of cross-reactions in the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of Staphylococcus aureus enterotoxin type B in culture filtrates and foods. J.Food Safety, 2:35-45.

KORKEALA, H. and V. HIRVELA (1981) The effect of various stress treatments on the coagulase test in Staphylococcus aureus. Nord.Vet.-Med., 33:434-440.

KOUPAL, A. and R. H. DEIBEL (1978) Rapid qualitative method for detecting staphylococcal nuclease in foods. Appl. Environ. Microbiol., 35:1193-1197.

KUD, J. K. S. and S. J. SILVERMAN (1980) Application of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in food. J. Food Protect., 43:404-407.

KUSCHFELDT, D. (1980) Vorkommen und Bedeutung von Staphylokokken in streichfähigen Rohwürsten. Fleischwirtschaft, 60:1-4.

LACEY, R. W. (1975) Antibiotic resistance plasmids of Staphylococcus aureus and their clinical importance. Bacteriol. Rev., 39:1-32.

LACHICA, R. V. F., P. D. HOEFERICH and H. P. RIEMANN (1972) Tolerance of staphylococcal thermonuclease to stress. Appl. Microbiol., 23:994-997.

LACHICA, R. V. F., C. GENIGERGIS and P. D. HOEFERICH (1971a) Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. Appl. Microbiol.,

21:585-587.

LACHICA, R.V.F., P.D.HOEPRICH and C.GENIGEORGIS (1971b)

Nuclease production and lysostaphin susceptibility of
Staphylococcus aureus and other catalase-positive cocci.

Appl.Microbiol., 21:823-826.

LANGEVELD, L.P.M and A.C.BOLLE (1979) Duration of the

pre-incubation period in the sterility control of
UHT-sterilized milk. Neth.Milk Dairy J., 33:172-180.

LECHOVICH, R.V., J.B.EVANS and C.F.NIVEN (1956) Effect of

curing ingredients and procedures on the survival and
growth of staphylococci in and on cured meats.

Appl.Microbiol., 4:360-363.

LEE, I.C.-H. (1975) Production and thermal inactivation of

staphylococcal enterotoxins in meat systems. Diss.
Abstr.Int., B, 36:1126.

LEE, W.H., C.L.STAPLES and J.C.OLSON (1975) Staphylococcus

aureus growth and survival in macaroni dough and the
persistence of enterotoxins in the dried products.

J.Food Sci., 40:119-120.

LEE, C., L.G.HARMON and J.F.PRICE (1977) Growth and

enterotoxin production by staphylococci in genoa salami.
J.Food Protect., 40:325-329.

- LEE, A.C.-M., R.N.ROBBINS, R.F.REISER and M.S.BERGDOLL (1980)
Isolation of specific and common antibodies to
staphylococcal enterotoxins B, C1 and C2. Infect.Immun.,
27:431-434.
- LEE, R.Y., G.J.SILVERMAN and D.T.MUNSEY (1981) Growth and
enterotoxin A production by Staphylococcus aureus in
precooked bacon in the intermediate moisture range.
J.Food Sci., 46:1687-1692.
- LENZ, W., R.THELEN, P.PICKENHAHN and H.BRANDIS (1983) Nachweis
von Enterotoxin in Kulturüberständen von Staphylococcus
aureus mit dem ELISA-Test und dem Microslide-Test.
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt., Orig.A, 253:466-475.
- LINDROTH, S. and A.NISKANEN (1977) Double antibody solid-phase
radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A.
Eur.J.Appl.Microbiol., 4:137-143.
- LIU, C.T. and R.P.SANDERS (1980) Modification of lethality
induced by staphylococcal enterotoxin B in Dutch
rabbits. Am.J.Vet.Res., 41:399-404.
- LIU, C.T., J.D.HELM and W.R.BEISEL (1976) Cardiovascular and
vomiting responses to a lethal intravenous dose of
staphyloenterotoxin A in rhesus monkeys.
J.Med.Primatol., 5:353-359.

LIU, C.T., R.T. DeLAUTER and R.T. FAULKNER (1977) Cardiovascular and hepatic responses of rhesus macaques to staphylococcal enterotoxin B. Am.J.Vet.Res., 38: 1849-1854.

LOTTER, L.P. and L. LEISTNER (1978) Minimal water activity of enterotoxin A production and growth of Staphylococcus aureus. Appl. Environ. Microbiol., 36: 377-380.

MAGRINI, R.C., J. CHIRIFE and J.L. PARADA (1983) A study of Staphylococcus aureus growth in model systems and processed cheese. J. Food Sci., 48: 882-885.

MAH, R.A., D.Y.C. FUNG and S.A. MORSE (1967) Nutritional requirements of Staphylococcus aureus S-6. Appl. Microbiol., 15: 865-870.

MARCHAND, D. (1980) Contribution à l'étude de la thermonuclease dans l'identification des staphylocoques enterotoxigeniques. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de Creteil. 68 pp.

MARIUS, I.H. and G.J. SILVERMAN (1970) Factors affecting the secretion of staphylococcal enterotoxin A. Appl. Microbiol., 20: 492-496.

MARLAND, R.E. (1967) The effects of several environmental

factors on the growth and enterotoxigenicity of S-6
Staphylococcus aureus. Diss.Abstr., 27:3165

MARSHALL, R.T., C.D. NEIGHBORS, AND J.E. EDMONSDSON (1971)
Isolation of staphylococci from dried milk. J. Milk Food
Technol., 28:117-120.

MCCOY, D.W. and J.E. FABER (1966) Influence of food
microorganisms on staphylococcal growth and enterotoxin
production in meat. Appl. Microbiol., 14:372-377.

MCLEAN, R.A., H.D. LILLY and J.A. ALFORD (1968) Effects of
meat-curing salts and temperature on production of
staphylococcal enterotoxin B. J. Bacteriol., 95:1207-1211.

METAXOPOULOS, J., C. GENIGEORGIS, M.J. FANELLI, C. FRANTI AND
E. COSMA (1981) Production of Italian dry salami: effect
of starter culture and chemical acidulation on
staphylococcal growth in salami under commercial
manufacturing conditions. Appl. Environ. Microbiol.,
42:863-871.

METCALF, R.H. and R.H. DEISEL (1959) Staphylococcus aureus
response to lysostaphin in some fermented foods.
Appl. Microbiol., 17:63-67.

METZEL, D., H. NOLL, H. MOCHMANN, U. RICHTER, W. KARSCH und
W. WITTE (1975) Enterotoxin-A-bildende Staphylokokken im

Eiersalat als Ursache einer Lebensmittelvergiftung.
Dt.Gesundh.-Wesen., 33:614-618.

METZGER, J.F., A.D. JOHNSON, W.S. COLLINS and V. MCGGANN (1973)
Staphylococcus aureus enterotoxin B release (excretion)
under controlled conditions of fermentation.
Appl. Microbiol., 25:770-773.

MEYER, R.F. and M.J. PALMIERI (1980) Single radial
immunodiffusion method for screening staphylococcal
isolates for enterotoxin. Appl. Environ. Microbiol.,
40:1080-1085.

MIERT, A.S.J.P.A.M. van, C.T.M. van DUIN, J.H.M. VERHEIJDEN and
A.J.H. SCHOTMAN (1983) Staphylococcal enterotoxin B and
Escherichia coli endotoxin: comparative observations in
goats on fever and associated clinical hematologic and
blood biochemical changes after intravenous and
intramammary administration. Am. J. Vet. Res., 44:955-963.

MIERT, A.S.J.P.A.M. van, C.T.M. van DUIN and A.J.N. SCHOTMAN
(1984) Comparative observations of fever and associated
clinical hematological and blood biochemical changes
after intravenous administration of staphylococcal
enterotoxins B and F (Toxic shock syndrome Toxin-1) in
goats. Infect. Immun., 46:354-360.

MILLER, R.D. and D.Y.C. FUNG (1973) Amino acid requirements for

the production of enterotoxin B by Staphylococcus aureus S-6 in a chemically defined medium. Appl.Microbiol., 25:800-806.

MILLER,B.A., R.F.REISER and M.S.BERGDOLL (1978) Detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, and E in foods by radioimmunoassay, using staphylococcal cells containing protein A as immunoadsorbent. Appl.Environ. Microbiol., 36:421-426.

MINISTERIO DE AGRICULTURA (1975) Catalogo de quesos españoles. 2a edicion.

MINOR,T.E. and E.H.MARTH (1970) Growth of Staphylococcus aureus in acidified pasteurized milk. J.Milk Food Technol., 33:516-520.

MINOR,T.E. and E.H.MARTH (1972a) Staphylococcus aureus and enterotoxin A in cream and butter. J.Dairy Sci., 55:1010-1014.

MINOR,T.E. and E.H.MARTH (1972b) Loss of viability by Staphylococcus aureus in acidified media. I. Inactivation by several acids, mixtures of acids, and salts of acids. J.Milk Food Technol., 35:191-196.

MINOR,T.E. and E.H.MARTH (1972c) Fate of Staphylococcus aureus in cultured buttermilk, sour cream, and yogurt

during storage. J.Milk Food Technol., 35:302-306.

MINOR, T.E. and E.H. MARTH (1972d) Loss of viability by Staphylococcus aureus in acidified media. II. Inactivation by acids in combination with sodium chloride, freezing, and heat. J.Milk Food Technol., 35:548-555.

MDL, H., and H.M. VINCENTIE (1975) Staphylococci in kaas bereid uit rauwe melk. Tijdschr. Diergeneesk., 100:991-994.

MONTANARO, D., U. del PRETE e G. RIBERA (1978) Elaborazione sperimentale di enterotossina staphilococica A e B in formaggio mozzarella. Nuovi Annali d'Igiene e Microbiologia, 29:25-31.

MORENO, B. y J.J. FRANCISCO (1984) Clasificación en especies de cepas de estafilococos aisladas de manipuladores de alimentos. Resúmenes de la 4 Reunión Científica del Grupo de Microbiología de los Alimentos. Pamplona.

MORA, B., A. BLANCO, M.G. MOSQUERA, L. RODRIGUEZ y C. TERESA (1984) Resúmenes de la 4 Reunión Científica del Grupo de Microbiología de los Alimentos. Pamplona.

MORITA, T.N. and M.J. WOODBURN (1978) Homogeneous enzyme immune assay for staphylococcal enterotoxin B. Infect. Immun.,

21:666-668.

MORITA, T.N. and M. WOODBURN (1983) Enterotoxin C2 production by S.aureus in entree salads. J.Food Sci., 48:243-245.

MORSE, S.A. and J.N. BALDWIN (1971) Regulation of staphylococcal enterotoxin B: effect of thiamine starvation. Appl.Microbiol., 22:242-249.

MORSE, S.A. and R.A. MAH (1967) Microtiter hemagglutination-inhibition assay for staphylococcal enterotoxin B. Appl.Microbiol., 15:58-61.

MORSE, S.A. and R.A. MAH (1973) Regulation of staphylococcal enterotoxin B: effect of anaerobic shock. Appl.Microbiol., 25:553-557.

MORSE, S.A., R.A. MAH and W.J. DOBRZOGOSZ (1969) Regulation of staphylococcal enterotoxin B. J.Bacteriol., 98:4-9.

MOSSEL, D.A.A. and M. INGRAM (1955) The physiology of the microbial spoilage of foods. Citado por NISKANEN (1977).

NAKANE, P.K. and A. KAWADI (1974) Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. J.Histochem.Cytochem., 22:1084-1091.

NDERU, F.M.K. and C. GENIGEORGIS (1975) Prediction of sta-

phylococcal growth in cured meats. 20th World Vet. Congress. Mexico City. Proceedings.

NG, H. and J.A. GARIBALDI (1975) Death of Staphylococcus aureus in liquid whole egg near pH 8. Appl. Microbiol., 29:782-786.

NISKANEN, A. (1977) Staphylococcal enterotoxins and food poisoning. Production, properties and detection of enterotoxins. Tech. Res. Centr. Finl. 83 pp.

NISKANEN, A. and M. AALTO (1978) Comparison of selective media for coagulase-positive enterotoxigenic Staphylococcus aureus. Appl. Environ. Microbiol., 35:1233-1236.

NISKANEN, A. and L. KOIRANEN (1977) Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources. Citado por NISKANEN (1977).

NISKANEN, A. and S. LINDROTH (1976) Preparation of labeled staphylococcal enterotoxin A with high specific activity. Appl. Environ. Microbiol., 32:745-740.

NISKANEN, A. and E. NURMI (1976) Effect of starter culture on staphylococcal enterotoxin and thermonuclease production in dry sausage. Appl. Environ. Microbiol., 31:11-20.

NIYOMVIT, N., K.E. STEVENSON and R.F. McFEETERS (1978) Detection of staphylococcal enterotoxin B by affinity chromatography. J. Food Sci., 43:735-739.

NOLETO, A.L. and M.S. BERGDOLL (1980) Staphylococcal enterotoxin production in the presence of non-enterotoxigenic staphylococci. Appl. Environ. Microbiol., 39:1167-1171.

NORMANN, S.J., R.F. JAEGER and R.T. JOHNSEY (1969) Pathology of experimental enterotoxemia. The "in vitro" localization of staphylococcal enterotoxin B. Lab. Invest., 20:17-25.

NOTERMANS, S. and L.J. HEUVELMAN (1983) Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of Staphylococcus aureus. J. Food Sci., 48:1832-1840.

NOTERMANS, S. and J.W. KOFER (1979) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of Staphylococcus aureus enterotoxin. Antonie van Leeuwenhoek, 45:625.

NOTERMANS, S., H.L. VERJANS, J. BOL and M. SCHOTHORST (1978) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of Staphylococcus enterotoxin type B. Health Lab. Sci., 15:28-31.

NOTERMANS, S., W.J. van LEEUWEN, J. DUFRENNE and P.D. TIPS (1983)

Serum antibodies to enterotoxin production by Staphylococcus aureus with special reference to enterotoxins F and toxic shock syndrome.

NUÑEZ GUTIERREZ, M. (1980) I curso de Microbiología de la Leche y los Productos Lácteos. Citado por VADILLO (1984).

NURMI, E. AND L. KOIRANEN (1967) Bacteriological review of milk samples from clinical mastitis. Nord. Vet.-Med., 1-77.

NYHAN, J. F. AND G. T. L. ARCHER (1967) Phagetypes of Staphylococcus aureus in herd bulk milk and in quarter samples. vet. record, 202-205.

OLSVIK, D., K. FOSSUM and B. P. BERDAL (1982) Staphylococcal enterotoxin A, B, and C produced by coagulase-negative strains within the family Micrococcaceae. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., 90:441-444.

ORTH, D. S. (1977) Statistical analysis and quality control in radioimmunoassays for staphylococcal enterotoxins A, B, and C. Appl. Environ. Microbiol., 34:710-714.

PAL ET AL. (1970)

PARK, C. E., N. DICKIE, H. ROBERN, S. STAVRIC AND E. C. D. TODD (1973) Comparison of solid-phase radioimmunoassay and

slide gel double diffusion method for the detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Citado por NISKANEN 91977).

PATTEE, P.A. and B.A. GLATZ (1980) Identification of a chromosomal determinant of enterotoxin A production in Staphylococcus aureus. Appl. Environ. Microbiol., 39: 186-193.

PAUL, M.E. and N.N. POTTER (1978) Bacterial growth in whole egg and egg substitutes including inoculation with Staphylococcus aureus and Clostridium perfringens. J. Food Sci., 43:803-806.

PEPPER, E.A., J. MELLING and R.C.W. BERKELEY (1981) Studies on the effect of inhibition of lipid biosynthesis by cerulenin on the production of staphylococcal enterotoxin A. Zbl. Bakt., Suppl. 10:393-396.

PETERKIN ET AL. (1985) Effect of homogenation procedures on Escherichia coli counts in naturally contaminated cheese. Can. J. Microbiol., 180-182.

PETERSON, A.C., J.J. BLACK and M.F. GUNDERSON (1962) Staphylococci in competition. I. Growth of naturally occurring mixed populations in precooked frozen foods during defrost. Appl. Microbiol., 10:16-22.

PETERSON ET AL. (1970)

PETTIT, G.W., M.R. ELWELL and P.B. JAHRLING (1977) Possible endotoxemia in rabbits after intravenous injection of Staphylococcus aureus enterotoxin B. J. Infect. Dis., 135:646-648.

PLISZKA, A. and B. WINDYGA (1972) Detection of staphylococcal enterotoxin B in foods by immunofluorescence method. Part I. Detection. Roczn. Pzh., 23:565-574.

POWERS, E.M., D. BERKOWITZ and G.C. WALKER (1981) Bacteriology, water activity and moisture/salt ratio of six brands of precooked canned bacon. J. Food Protect., 44:447-449.

PRICE, R.J. and J.S. LEE (1970) J. Milk Food Technol., 33:13.
Citado por IBRAHIM (1978)

RAJ, H.D. and M.S. BERGDOLL (1969) Effect of enterotoxin B on human volunteers. J. Bacteriol., 98:833-834.

READ, R.B. and J. BRADSHAW (1966) Staphylococcal enterotoxin B thermal inactivation in milk. J. Dairy Sci., 49:202-203.

READ, R.B., J. BRADSHAW, W.L. FRITCHARD and L.A. BLACK (1965) Assay of staphylococcal enterotoxin from cheese. J. Dairy Sci., 48:420-424.

REISER, R.F. and M.S. BERGDOLL (1979) Citado por BERGDOLL (1983).

REISER, R.F. and R.F. WEISS (1969) Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C in various media. Appl. Microbiol., 18:1041-1043.

REISER, R., D. CONAWAY and M.S. BERGDOLL (1974) Detection of staphylococcal enterotoxin in food. Appl. Microbiol., 27:83-85.

REISER, R.F., R.N. ROBBINS, A.L. NOLETO, G.P. KHOE and M.S. BERGDOLL (1983) Identification, purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C3. Biochemistry,

REITER, B., B.G. FEWINS, T.F. FRYER and M.E. SHARPE (1964) Factors affecting the multiplication and survival of coagulase-positive staphylococci in Cheddar cheese. J. Dairy Res., 31:261-272.

RICHARDSON, G.H. and M.A. DIVTIA (1973) Lactic culture inocula required to inhibit staphylococci in sterile milk. J. Dairy Sci., 56:706-709.

RIEMANN, H., W.H. LEE AND C. GENIGEORGIS (1972) Control of Clostridium botulinum and Staphylococcus aureus in semi-preserved meat products. J. Milk Food Technol.,

35:514-523.

RIEMANN, H., W. H. LEE and C. GENIGEORGIS (1972) Control of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus* in semi-preserved meat products. *J. Milk Food Technol.*, 35:514-523.

ROBBINS, R. N. and M. S. BERGDOLL (1984) Production of rabbit antisera to the staphylococcal enterotoxins. *J. Food Protect.*, 47:172-176.

ROBBINS, R. N., S. GOULD and M. S. BERGDOLL (1974) Detection the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, 28:946-950.

ROBERN, H. and T. M. GLEESON (1978) The use of polyethylene glycol in radioimmunoassay of staphylococcal enterotoxins. *Can. J. Microbiol.*, 24:765-766.

ROBERN, H., M. DIGHTON, Y. YANO and N. DICKIE (1975) Double-antibody radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin C2. *Appl. Microbiol.*, 30:525-529.

ROBERN, H., T. M. GLEESON and R. A. SZABO (1978) Double-antibody radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxins A and B. *Can. J. Microbiol.*, 24:436-439.

ROBINTON, E. D. (1949) The effect of staphylococcal enterotoxin

upon the frog. Citado por NISKANEN (1977).

SALOMON, L.L. and R.W. TEW (1968) Assay of staphylococcal enterotoxin B by latex agglutination. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 129:539-542.

SANTOS, E.C. dos, C. GENIGEORGIS and T.B. FARVER (1981) Prevalence of Staphylococcus aureus in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas cheese. *J. Food Protect.*,

SATTERLEE, L.D. and A.A. KRAFT (1969) Effect of meat and isolated meat proteins on the thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B. *Appl. Microbiol.*, 17: 906-909.

SAUNDERS, G.C. and M.L. BARTLETT (1977) Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34:518-522.

SAUNDERS, G.C. and E.H. CLINARD (1977) Application of the indirect enzyme-labeled antibody microtest to the detection and surveillance of animal diseases. *J. Infect. Dis.*, 136:S258-S266.

SCOTT, W.J. (1953) Water relations of Staphylococcus aureus at 50°C. *Aust. J. Biol. Sci.*, 6:549-564.

SCHANTZ,E.J., W.G.ROESSLER, J.WAGMAN, L.SPERO, D.A.DUNNERY
and M.S.BERGDOLE (1965) Purification of staphylococcal
enterotoxin B. Biochemistry, 4:1011-1016.

SCHEUSNER,D.L. and L.G.HARMON (1973) Growth and enterotoxin
production by various strains of Staphylococcus aureus
in selected foods. J.Food Sci., 38:474

SCHEUSNER,D.L., L.L.HOOD and L.G.HARMON (1973) Effect of
temperature and pH on growth and enterotoxin production
by Staphylococcus aureus. J.Milk Food Technol.,
36:249-252.

SCHOUWENGURG-VAN FOEKEN,W.J., J.STADHOUDERS and J.A.JANS
(1978) The thermonuclease test for assessment of the
growth of coagulase-positive staphylococci in Gouda
cheese with a normal acidity development. Neth.Milk
Dairy J., 32:217-231.

SHAFFER,W.M. and J.J.IANDOLO (1978) Chromosomal locus for
staphylococcal enterotoxin B. Infect.Immun., 20:273-278.

SHAFFER,W.M. and J.J.IANDOLO (1979) Genetics of staphylococcal
enterotoxinB in methicillin-resistant isolates of
Staphylococcus aureus. Infect.Immun., 25:902-911.

SHAFFER,W.M. and J.J.IANDOLO (1980) Transduction of

staphylococcal enterotoxin B synthesis: establishment of the toxin gene in a recombination-deficient mutant. Infect.Immun., 27:280-282.

SHALITA,Z., I.HERTMAN and S.SARID (1977) Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production of Staphylococcus aureus. J.Bacteriol., 129: 317-325.

SILVERMAN,S.J., A.R.KNOTT and M.HOWARD (1968) Rapid, sensitive assay for staphylococcal enterotoxin and a comparison of serological methods. Appl.Microbiol., 16:1019-1023.

SIMON,E. und G.TERPLAN (1977) Nachweis von Staphylokokken Enterotoxin B mittels ELISA-Test. Zbl.Vet.Med.B, 24:842-844.

SPERO,L., J.R.WARREN and J.F.METZGER (1965) Amino acid composition and terminal amino acids of staphylococcal enterotoxin B. Biochemistry, 4: 1024-1030.

SPERO,L., H.M.JACOBY, J.E.DALIDOWICZ and S.J.SILVERMAN (1971) Guanidination and nitroguanidination of staphylococcal enterotoxin B. Biochim.Biophys.Acta, 251:345-354.

STADHOUDERS,J. (1976) Citado en el Boletin de la Federation Internationale de Laiterie (1980).

STARK, R.L. and F.R. MIDDAGH (1970) Immunofluorescent detection of enterotoxin B produced under CO₂ and N₂ atmospheres. *Appl. Microbiol.*, 20:519-520.

STIFFLER-ROSENBERG, G. and H. FEY (1978) Simple assay for staphylococcal enterotoxins A, B, and C: modification of enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 8:473-479.

STILES, M.E. and P.C. CLARK (1974) The reliability of selective media for the enumeration of unheated and heated staphylococci. *Can. J. Microbiol.*, 20:1735-1744.

SUAREZ FERNANDEZ, G. (1966) Microflora estafilocócica de leche natural. *Anales Facultad de Veterinaria de León*, 12:11-166.

SUAREZ FERNANDEZ, G. (1979) Investigación de un brote tóxico alimentario de probable origen estafilocócico utilizando un método de precipitación por difusión en gel con una sensibilidad óptima. *An. Inst. Invest. Veter.*, 25:303-309.

SUAREZ, G. y S. OVEJERO (1976) Intoxicación estafilocócica. Prevención y control. *Circ. Farmac.*, 25:375-383.

SUGIYAMA, H. and T. HAYAMA (1965) Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxin in the

monkey. J.Infect.Dis., 115:330-336.

SUGIYAMA,H., E.M.McKISSIC and M.S.BERGDOLL (1963) Sensitivity of thorotrast-treated monkeys to staphylococcal enterotoxin. Proceed.Soc.Exp.Biol.Med., 108:92-95.

SUGIYAMA,H., M.S.BERGDOLL and G.M.DACK (1958) Staphylococcal enterotoxins: increase vomiting incidence in monkeys following subemetic doses of dihydroergotamine. Proceed.Soc.Exper.Biol.Med., 97:900-903.

SUGIYAMA,H., K.L.CHOW and L.R.DRAGSTEDT (1961) Study of emetic receptor sites for staphylococcal enterotoxin in monkeys. Proceed.Soc.Exp.Biol.Med., 108:92-95.

SUGIYAMA,H., M.S.BERGDOLL and G.M.DACK (1962) Early development of a temporary resistance to the emetic action of staphylococcal enterotoxin. J.Infect.Dis., 111:233-238.

SURGALLA (1947) citado por SURGALLA et al. (1953).

SURGALLA,M.J., M.S.BERGDOLL and G.M.DACK (1953) Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin by the monkey-feeding test. J.Lab.Clinic.Med., 41:782-788.

TAKAHASHI,I. and C.K.JONES (1959) J.Dairy Sci., 42:1032.

Citado por IBRAHIM (1978).

TATINI, S.R. (1973) Influence of food environments on growth of Staphylococcus aureus and production of various enterotoxins. J.Milk Food Technol., 36:559.

TATINI, S.R., J.J.JEZESKI, J.C.OLSON and E.P.CASMAN (1970) Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A in milk. J.Dairy Sci., 54:312-320.

TATINI, S.R., J.J.JEZESKI, J.C.OLSON and E.P.CASMAN (1971a) Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A in milk. J.Dairy Sci., 54:312.

TATINI, S.R., J.J.JEZESKI, H.A.MORRIS, J.C.OLSON and E.P.CASMAN (1971b) Production of staphylococcal enterotoxin A in Cheddar and Colby cheeses. J.Dairy Sci., 54:815.

TATINI, S.R., W.D.WESALA, J.J.JEZESKI and H.A.MORRIS ET AL. (1973) Production of staphylococcal enterotoxin A in blue, brick, mozzarella and swiss cheeses. J.Dairy Sci., 56:449

TATINI, S.R., H.M.SOO, E.R.CORDS and R.W.BENNETT (1975) Heat-stable nuclease for assessment of staphylococcal growth and likely presence of enterotoxins in foods. J.Food Sci., 40:352-356.

TATINI, S.R., S.A. STEIN and H.M. SOD (1976) Influence of protein supplements on growth of Staphylococcus aureus and production of enterotoxins. J. Food Sci., 41:133-135.

THATCHER, F.S. (1966) Food-borne bacterial toxins. Can. Med. Assoc. J., 94:582-590.

THATCHER, F.S., R.D. COMTOIS, D. ROSS and I.E. ERDMAN (1959) Can. J. Public Health, 50:497. Citado por Boletín de la Federación Internacional Laitière (1980)

THATCHER, F.S., J. ROBINSON and I. ERDMAN (1962) The "vacuum pack" method of packaging foods in relation to the formation of the botulinum and staphylococcal toxins. J. Appl. Bacteriol., 25:120-124.

THOMAS, N. and V.K.N. NAMBU DRIPAD (1974) Production of an extracellular thermostable DNase and enterotoxin by enterococci. Citado por TATINI et al. (1976).

THOMPSON, R. and A. JOHNSON (1951) The inhibitory action of saliva on the diphtheria bacillus. Hydrogen peroxide, the inhibitory agent produced by salivary streptococci. J. Infect. Dis., 88:81-85.

THOTA, F.H., S.R. TATINI and R.W. BENNETT (1973) Effect of temperature, pH and NaCl on production of staphylococcal

enterotoxins E and F. Citado por GENIGEORGIS (1981)

TODD, E., R. SZABO, H. ROBERN, R. GLEESON, C. PARK and D. S. CLARK
(1981) Variation in counts, enterotoxin levels and TNase
in swiss-type cheese contaminated with Staphylococcus
aureus. J. Food Protect., 44:839-848.

TOMPKIN, R. B., J. M. AMBROSINO and S. K. STOZEK (1973) Effect of
pH, sodium chloride, and sodium nitrite on enterotoxin A
production. Appl. Microbiol., 26:833-837.

TROLLER, J. A. (1971) Effect of water activity on enterotoxin B
production and growth of Staphylococcus aureus.
Appl. Microbiol., 21:435-439.

TROLLER, J. A. (1972) Effect of water activity on enterotoxin A
production and growth of Staphylococcus aureus.
Appl. Microbiol., 24:440-443.

TROLLER, J. A. and W. C. FRAZIER (1963a) Repression of
Staphylococcus aureus by food bacteria. I. Effect of
environmental factors on inhibition. Appl. Microbiol.,
11:11-14.

TROLLER, J. A. and W. C. FRAZIER (1963b) Repression of
Staphylococcus aureus by food bacteria. II. Causes of
inhibition. Appl. Microbiol., 11:163-165.

- TROLLER, J.A. and J.V. STINSON (1975) Influence of water activity on growth and enterotoxin formation by Staphylococcus aureus in foods. *J. Food Sci.*, 40:802-804.
- TUCKEY, S.L., M.E. STILES, Z.J. ORDAL and L.D. WITTER (1964) *J. Dairy Sci.*, 47:604. Citado en el Boletín de la Federación Internationale de Laiterie (1980).
- TWETEN, R.K. and J.J. IANDOLO (1981) Purification and partial characterization of a putative precursor to staphylococcal enterotoxin B. *Infect. Immun.*, 54:900-907.
- TWETEN, R.K. and J.J. IANDOLO (1983) Transport and processing of staphylococcal enterotoxin B. *J. Bacteriol.*, 153: 297-303.
- VADILLO MACHOTA, S. (1984) Contaminación bacteriana y fungica en la leche natural y pasteurizada de la zona centro. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- VANDENBOSCH, L.L., D.Y.C. FUNG and M. WIDOMSKI (1973) Optimum temperature for enterotoxin production by Staphylococcus aureus S6 and 137 in liquid medium. *Appl. Microbiol.*, 25:498-500.
- VAUGHN, V.C. (1884) Poisonous or sick cheese. Citado por NISKANEN (1977)

VEISSEYRE, R. (1980) Lactologia tecnica. Editorial Acribia.
Zaragoza

VERRIPS, C.T. and R. van RHEE (1981) Heat inactivation of
Staphylococcus epidermidis at various water activities.
Appl. Environ. Microbiol., 41:1128-1131.

WAES, G. (1977) Revue de l'Agriculture, 30:817. Citado en el
Boletin de la Federation Internationale de Laiterie
(1980).

WALKER, G.C., L.G. HARMON and C.M. STINE (1961) J. Dairy Sci.,
44:1272. Citado en el Boletin de la Federation
Internationale de Laiterie (1980).

WARREN, J.R., L. SPERO and J.F. METZGER (1974) Isothermal
denaturation of aqueous staphylococcal enterotoxin B by
guanidine hydrochloride, urea and acid pH. Biochemistry,
13:1678-1683.

WARREN, J.R., L. SPERO, J.F. METZGER and V.G. MCGANN (1975)
Immunogenicity of formaldehyde-inactivated enterotoxins
A and C1 of Staphylococcus aureus. J. Infect. Dis.,
131:535-542.

WEBER, P. (1968) Citado en el Boletin de la Federation
Internationale de Laiterie (1980).

WEIRETHER, F.J., E.E. LEWIS, A.J. ROSENWALD and R.E. LINCOLN
(1966) Rapid quantitative serological assay of
staphylococcal enterotoxin B. Appl. Microbiol., 14:
284-291.

WEISS, K.F. and R.N. ROBBINS (1970) Relationship between
staphylococcal antiserum titer and zone development on
immune serum plates. Appl. Microbiol., 19:911-914.

WILLIAMS, R.E.O. (1963) Healthy carriage of Staphylococcus
aureus: its prevalence and importance. Bacteriol. Rev.,
27:56-71.

WILSON, B.J. (1959) Comparative susceptibility of chimpanzees
and Macaca mulatta monkeys to oral administration of
partially purified staphylococcal enterotoxin. J.
Bacteriol., 78:240-242.

WOODBURN, M., T.N. MORITA and S.Z. VENN (1973) Production of
staphylococcal enterotoxin A, B, and C in colloidal
dispersions. Appl. Microbiol., 25:825-833.

WOODBURN, M.J., T.N. MORITA, K. ROWE and S.S. PARK (1978)
Staphylococcal enterotoxin A and C production with
various sugars as energy source. J. Food Protect.,
41:643-646.

-517-

WU, C.-H. and M.S. BERGDOLL (1971) Stimulation of enterotoxin B production. I. Stimulation by fractions from a pancreatic digest of casein. Infect. Immun., 3:777-783.

YAMADA, S., H. IGARASHI and T. TERAYAMA (1977) Improved reversed passive hemagglutination for simple and rapid detection of staphylococcal enterotoxins A-E in food. Microbiol. Immunol., 21:675-682,

ZEHRN, V.L. and V.E. ZEHRN (1968) Relation of acid development during cheesemaking to development of staphylococcal enterotoxin A. J. Dairy Sci., 51:645-649.



BIBLIOTECA